

B15

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/059143 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/77,
C07K 14/34

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014263

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Dezember 2004 (15.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 59 595.3 18. Dezember 2003 (18.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Burkhard
[DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE).
ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346
Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE];
Rastatter Str. 10, 68239 Mannheim (DE). SCHRÖDER,
Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nussloch (DE).
HAEFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstrasse 11, 67063
Ludwigshafen (DE).

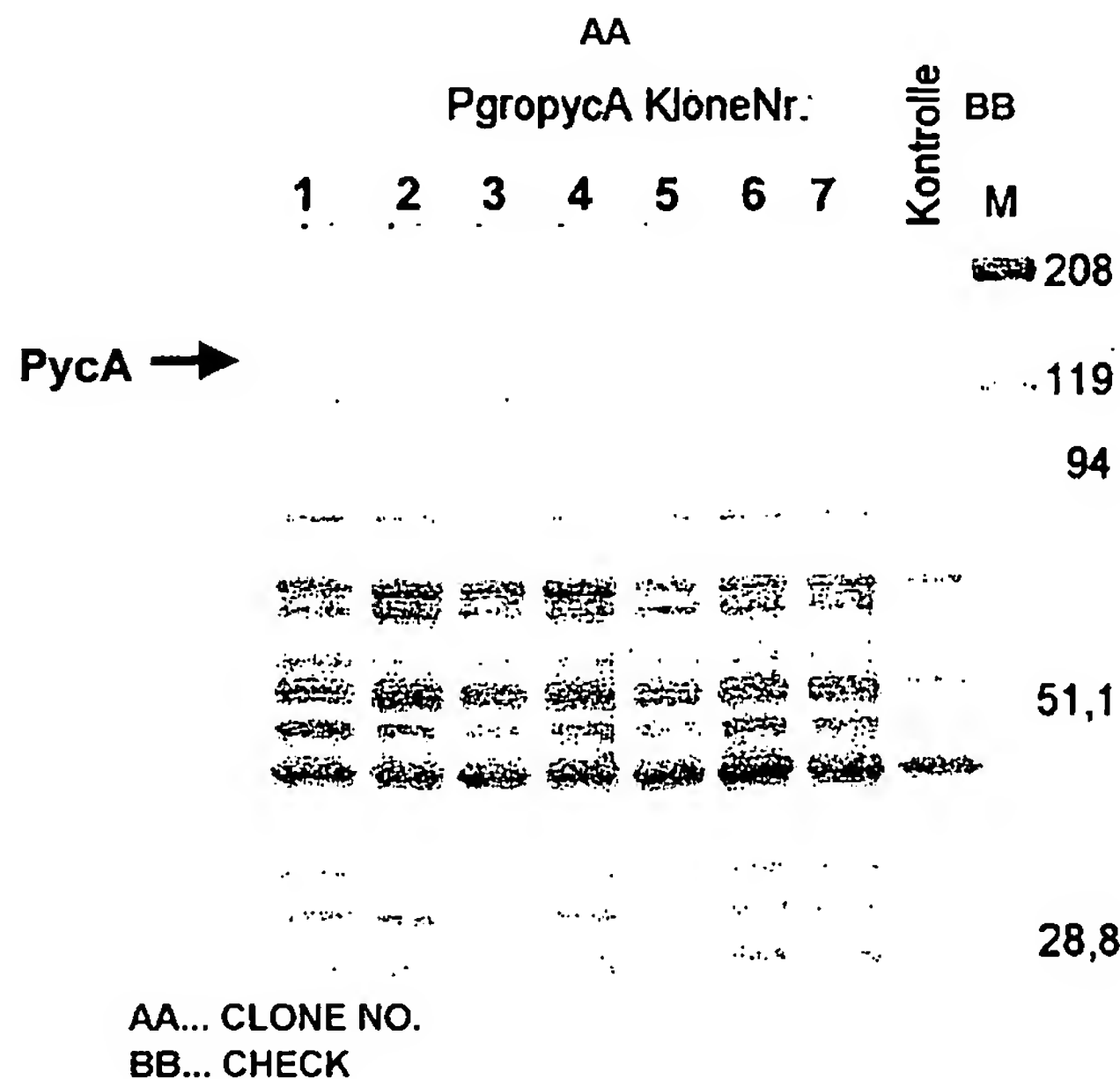
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF Aktiengesellschaft;
67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PGRO EXPRESSION UNITS

(54) Bezeichnung: PGRO-EXPRESSIONSEINHEITEN



(57) Abstract: The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/059143 A1



MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

Pgro-Expressionseinheiten

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthal-
- 10 tend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränder-
- ten Mikroorganismen.

- 15 Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemika-
- 20 lien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große
- 25 Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diesen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

- Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der
- 30 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationsstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchroma-
- 35 tographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Cory-*
- 40 *nebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

- Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.
- 5
- 10 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.
- 15
- Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodons der Translation befinden.
- 20
- In der Literatur (*E. coli* und *S. typhimurium*, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationsrate der Translation hat.
- 25
- Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli
- 30
- wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je
- 35
- nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.
- Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu
- 40
- nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

- 5
- In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch
- 10
- die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.
- 15
- Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierenden Strukturgen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturgen reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein
- 20
- entsprechender Induktor zugesetzt wird.
- 25

- Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.
- 30

- 35
- In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression genutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide beschrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebene Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

10

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressionseinheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend

20

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
- oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

25

zur Transkription von Genen verwenden kann.

30

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den ausgehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

35

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Produkt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfindungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in einem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als
- 15 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 20

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff „Wildtyp“ wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

30

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter „Wildtyp“ für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung *Corynebacterien* und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonders bevorzugt *Corynebakterien* bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T311I.

10

15

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

20

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promotors, beispielsweise durch Mutation des Promotors oder durch Stimulierung oder Hemmung des Promotors erfolgen.

30

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-

40

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

5 eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

- 20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

30 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz des GroES Chaperonin (Pgro) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps..

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete
35 Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-
40

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch
5 Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen
10 von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch
15 Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Multiple alignment parameter:
Gap opening penalty 10
Gap extension penalty 10
Gap separation penalty range 8
Gap separation penalty off
25 % identity for alignment delay 40
Residue specific gaps off
Hydrophilic residue gap off
Transition weighing 0

30 Pairwise alignment parameter:
FAST algorithm on
K-tuplesize 1
Gap penalty 3
Window size 5
35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

- 5 Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

- 10 Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

- 20 Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

- 25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.
- 30

- Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

- 35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

- 40

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz
5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie
30 beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory
35 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine
40 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

5 Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

10 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne
15 erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide
20 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

25 Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit ver-
30 standen.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

35 Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

- 10 Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 15 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

- 20 eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 10 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- 15 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit des GroES Chaperonin (Pgro) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30 Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35 Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität
40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens

15

10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

20

25

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

30

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

35

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

40

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-
gangssequenz aufweist.
20

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-
zugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.
25 ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.
30

Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend
40

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

10 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10") Sequenz; eine Minus 35 (" -35") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

15 Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies *Corynebakterien*, speziell für *Corynebacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter
20 Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der
25 DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele
35 für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer
40 and P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California

- (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

10 Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch
15 synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

20 Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden.
25 Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate
30 von gewünschten Genen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.
35

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -10-Region und -35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -Operatoren bekannt) für Regulationsproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzym gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzym abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenz SEQ. ID. NO. 52 die -10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar. Veränderungen

der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, er-

folgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

15 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

35 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

5 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

15 Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

20 In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

25 Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

30 Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls
35 weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

30

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

35

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

40

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man
- 20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
- 35 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

- d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Expressionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

- 5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

- 10 In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

- 20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

- 35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- 15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene ge-
- 30
- 35

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5
- Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
- 10
- Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-
- 15
- Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 20
- 25

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs- dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	---------------------------	---------------------	--------------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrognease	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot.: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot.: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot.: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	metH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot.: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot.: 4226
Methylentetrahydro-folat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot.: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot.: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot.: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxoreduktase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6- biphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6- phosphogluconolacto- nase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 51) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 50).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform, weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expression der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequenzen. Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebacterium glutamicum* die codon usage von *Corynebacterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

- Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils
- 5 obenstehende, nächstliegende Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.
- 10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:
- A Alanin
C Cystein
D Aspartat
15 E Glutamat
F Phenylalanin
G Glycin
H His
I Isoleucin
20 K Lysin
L Leucin
M Methionin
N Asparagin
P Prolin
25 Q Glutamin
R Arginin
S Serin
T Threonin
V Valin
30 W Tryptophan
Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinase
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Dehydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in coryneforme Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

5 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

15

20

Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

25

In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

30

35

40

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

5 Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert
10 werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991))
15 beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert,
25 der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al.,
30 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivanan (Bio-
35 technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

5 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

10 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Die Erfindung betrifft ferner eine genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

- bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

10

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

15

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

40

- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,
- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder
- 40 dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expres-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskassette.

Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung genetisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkrip-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller
 Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase,
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-
 Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-
 5 Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-
 Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-
 Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-
 Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyru-
 vat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II
 10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-
 Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
 Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase,
 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Argi-
 nyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Se-
 15 rinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-
 Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-
 Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von
 20 Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakte-
 rien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind insbesondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, ins-
 besondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutami-*
cum, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Cory-*
 30 *nebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacte-*
rium, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*
 und *Brevibacterium divaricatum*.

Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium*
 35 sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Coryne-*
bacterium acetoglutamicum ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC
 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium me-*
lassecola ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium effi-*
ciens DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum*
 40 ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit
5 der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung
DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevi-
bacterium* sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujiokense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20

Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

25

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

30

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

40

men.

Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.

10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.

15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.

20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.

25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-3,3'-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

- Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und
5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 *1. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen*

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,
15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren
20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbaupfade von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen"
25 Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin)
umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.
30

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie
40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pento- sephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-

5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-

Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Amino-

10 säure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

II. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen.

15 Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben

20 neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt

25 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder

30 anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

35 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and

40

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothenensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Pantothenat-Biosynthese bestehen aus 15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothenensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Pantothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Pantothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Pantothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die 25 Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoesäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p- 30 Aminobenzoesäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden. 35

- Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch 40 nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese
10 lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base,
20 einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die
25 RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.
30

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-
40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden
5 gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den
10 Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42,
15 Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide
20 werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für
25 viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukle-
30 otides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α,α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610;
40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diole wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane *et al.* (1998) *Science* 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

30

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-leucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine
15 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-
20 Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression
35 dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

40 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
- 20 Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität
- 25 des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität,
- 30 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

- Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-
- 35

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

5 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

15 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

20 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-
25 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-
30 Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität
35 II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren
40 kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

30

35

40

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und
5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzier-
10 te Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
15

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.
20

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,
30

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren
35
40

kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-
Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität dieses Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständige Fehlen der entsprechenden Aktivität.

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

Beispielsweise wird unter eine Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

10 Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase -Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

- 5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

10 Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

- 15 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdsubstanzen erfolgen.

20 Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch
25 Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht
30 werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bionotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98
35 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-
40 10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

5 Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder
15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch.
20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

35

- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5
- Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 10
- Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.
- 15
- Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

20 Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des
30 RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein
35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich
40 oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.
25

- Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.
30

- Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,
40

- wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- 10 Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.
- Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.
- 15 Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.
- 20 Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.
- 25 Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.
- 30 Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-
- 35 40

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

20

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25

Beispiel 1

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des pycA-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Pgro (SEQ ID 2)

30

Zur Amplifizierung des Promoters des Gens, das für das Chaperenin Gro ES kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ. ID. NO 5:

gro3: 5'- gccgcagcaaaccagtag -3'

35

SEQ. ID. NO. 6:

gro11: 5'- agtcgacacgatgaatccctccatgagaaaa-3'

40

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 427 bp entsprach.

Zur Amplifizierung eines Teils des Gens, das für das Pyruvat-Carboxylase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

5 SEQ. ID. NO. 7:

pyc6: 5'- ttttctcatggagggattcatcgtgtcgactcacacatcttcaacgcttccag-3'

SEQ. ID. NO. 8:

pyc3: 5'- cccgcagcaacgcacgcaagaaa-3'

10

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1344 bp entsprach.

15 Die Primer gro11 und pyc6 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

20 SEQ. ID. NO. 9:

gro12: 5'- gcattcgcgccgctcgtaacta-3'

SEQ. ID. NO. 10:

pyc11: 5'- ggttcccgcgccctggtaa-3'

25

Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1107 bp entsprach. Diese Pgro/pycA-Fusion wurde dann in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Pgro/pycA aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1125 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 11 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Pgro pycA bezeichnet.

30

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des pycA-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

35

SEQ. ID. NO. 12:

pyc14: 5'- ccggcgaagtgtctgctcgcgta-3'

40

SEQ. ID. NO. 13:

pyc15: 5'-accccgccccagttttc-3'

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 487 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 593 bp *SpeI/XbaI*-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob *sacB* *P_{sod}* ask kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym *NheI* verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob *sacB* *P_{gro}* *pycA* + US (SEQ. ID. NO. 14) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB *P_{gro}* *pycA* + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcgIM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcgIM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob *sacB* *P_{gro}* *pycA* + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/L Agar (Difco)) mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten.

Zur Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem *pycA*-Promoter und dem *pycA*-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob *sacB* vorhandenen *sacB*-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Synthese von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum* Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 15 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die *P_{gro}*-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomale DNA aus dem Ausgangsstamm und den 15 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H₂O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Jeweils 10 µl

der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Pgro-Expressionseinheit und dem pycA-Gen homolog sind.

- 5 Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 56°C; Amplifizierung 1 min bei 72°C; 30 Zyklen,; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch der natürlichen Expressionseinheit (PpycA) gegen Pgro vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe
10 von 310 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 15 Klonen 7 Klone positiv.

- Die 7 positiven Klone und der Ausgangsstamm wurden anschließend in 10 ml CM-Medium (10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco);
15 10 g/l Hefeextrakt) über Nacht angezogen. Anschließend wurde die Zellen pelletiert und in 0,5 ml Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl; pH7,7) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ribolyzers (3 x 30 sec bei Stufe 6, Fa. Hybaid). Nach einer Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode wurden jeweils 15 µg Protein auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt. Im
20 Vergleich zum Ausgangsstamm konnte eine erhöhte Menge an PycA-Protein detektiert werden (Figur 1). Figur 1 zeigt ein 10%iges SDS-Gel der Pgro pycA-Klone.

Beispiel 2

- 25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:15 und SEQ ID NO: 16 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:15

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACA
G-3'

- 35 SEQ ID NO:16

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

- Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer
40 SEQ ID NO:15 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen

- Smal, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:16 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.
- Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:17 und SEQ ID NO:18 eine Kanamycin-Resistenzcassette amplifiziert.
- SEQ ID NO:17
- 5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'
- SEQ ID NO:18:
- 5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'
- Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:17 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, Smal, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:18 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Puri-

- fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen
- 5 Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in
- 10 Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 15 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.
- 20 Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Di-
- 25 agnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955,
- 30 Virology, 1:190) erreicht.
- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.
- 35 Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:19 und SEQ ID NO: 20 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.
- 40 SEQ ID NO: 19

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 20:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

5

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 19 und SEQ ID NO: 20 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beiden synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO: 21 und SEQ ID NO: 22, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

40

SEQ ID NO: 21:

5'-TCGAATTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

5

SEQ ID NO22:

5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

10

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

25 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

30 Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO: 23 aufgeführt.

35

Beispiel 3

Herstellung des Plasmids PmetA metA

40 Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-

riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 24 und SEQ ID NO 25, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusive des nichtkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

SEQ ID NO 24

5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT -3'

und

10 SEQ ID NO 25

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30 Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pClik5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 26: aufgeführt.

40 Beispiel 9

Herstellung des Plasmid pCLiK5MCS Pgro meta

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-
5 riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 27 und SEQ ID NO 28, der chromoso-
malen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990)
PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Frag-
ment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Ex-
10 pressionseinheit) der Gens GroES (Pgro) amplifiziert.

SEQ ID NO: 27

5'-GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC -3'

und

15 SEQ ID NO :28

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGATGAATCCCTCCATGAG -3'

Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purifica-
tion Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

20

Ausgehend vom Plasmid PmetA meta als Template für eine PCR Reaktion wurde mit
den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO: 30 ein Teil von meta ampli-
fiziert.

25 SEQ ID NO 29

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

SEQ ID NO 30

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

30

Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem
GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gerei-
nigt.

35 In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente ge-
meinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID
NO: 28 eingebrachten, zu meta homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-
Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung
zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Stan-
40 dardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidpri-

mer SEQ ID NO: 27 und SEQ ID NO: 30 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.

- Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem
- 5 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel
- 10 Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt. Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO: 26 wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel
- 15 Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt. Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- 20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, be-
- 25 schrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)
- 30 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

- Das entstandene Plasmid pClik5MCS PGroESmetA ist als SEQ ID NO: 31 aufgeführt.
- 35

Beispiel 10

MetA-Aktivitäten

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA und pCLiK5MCS PGroESmetA nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 0,25g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 54 g Aces, 1 ml CaCl_2 (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 g/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CuSO_4 , 0,02 g/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), 100 µg/l Vitamin B₁₂, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfcup zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl_2 , 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

30

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS PGroESmetA	109,0

35

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit erheblich gesteigert werden.

Beispiel 11

5 Herstellung des Plasmids pClik5MCS metA ohne Startcodon

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 32 bis SEQ ID NO 33, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe
10 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die terminationsregion des groEL Gens amplifiziert.

15 SEQ ID NO 32

5'- GGATCTAGAGTTCTGTGAAAAACACCGTG-3'

SEQ ID NO 33

5'- GCGACTAGTGCCCCACAAATAAAAAACAC-3'

20

Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 60 bp Größe wurden mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen
25 XbaI und BclI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 23 wurde mit dem Restriktionsenzymen XbaI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit
30 GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem 60 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PgroES term SEQ ID NO: 34 aufgeführt.

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, das *metA* Gen ohne Startcodon amplifiziert.

SEQ ID NO 35

5'-GAGACATATGCCCACCCTCGCGCCTTCAGG -3'

und

SEQ ID NO 36

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,2 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen NdeI und BclI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

Der Vektor pCLiK5MCS groEL term SEQ ID NO: 34 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und BclI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS metA ohne Startcodon ist als SEQ ID NO: 37 aufgeführt.

10

Beispiel 12

Konstruktion von Expressionseinheiten Pgro mit unterschiedlichen spezifischen Expressionsaktivitäten durch unterschiedliche RBS-Sequenzen und Abstände zum Startcodon von metA

15

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 38 bis SEQ ID NO 43, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, die verschiedenen Expressionseinheiten amplifiziert. Dabei diente der Oligonukleotidprimer 1701 (SEQ ID NO 38) als sense Primer und wurde mit den anderen Oligonukleotidprimern kombiniert.

25

SEQ ID NO 38

Oligonukleotidprimer 1701

5'- GAGACTCGAGCGGCTTAAAGTTTGGCTGCC-3'

30

SEQ ID NO 39

Oligonukleotidprimer 1828

5'- ctctcatatgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 40

35

Oligonukleotidprimer 1831

5'- ctctcatatgcgcggccgcAATCCCTCCATGAGAAAAATT-3'

SEQ ID NO 41

Oligonukleotidprimer 1832

40

5'- ctctcatatgcAActctccATGAGAAAAATTTGTGTG-3'

SEQ ID NO 42

Oligonukleotidprimer 1833

5'- ctctcatatgcAAtctcctcATGAGAAAAATTTTGTGTG-3'

5

SEQ ID NO 43

Oligonukleotidprimer 1834

5'- ctctcatatgcAAtcccttcATGAGAAAAATTTTGTGTG-3'

- 10 Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- 15 Der Vektor pBS KS+ (SEQ ID NO: 44) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und ein 2,9 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

- 20 Das Vektorfragment wurde zusammen mit den PCR-Fragmenten mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

25

- Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.
- 30

Das entstandenen Plasmid wurden mit pKS Pgro 1701/1828, pKS Pgro 1701/1831, pKS Pgro 1701/1832, pKS Pgro 1701/1833 und pKS Pgro 1701/1834 bezeichnet.

- 35 Diese Plasmide wurden anschließend mit den Restriktionenzymen NdeI und XhoI geschnitten. Die erhaltenen DNA Fragmente von ca. 200 bp Größe wurden isoliert und mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- Der Vektor pCLiK5MCS metA ohne Sartcodon SEQ ID NO: 37 wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.
- 5 Das Vektorfragment wurde zusammen mit den 200 bp großen Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- 10 Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.
- 15 Die entstandenen Plasmide pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 metA sind als SEQ ID NO: 45 bis 49 aufgeführt.
- 20 Der Expressionseinheit Pgro wurde durch die Wahl der Oligonukleotide wie in Figur 2 beschrieben verändert.
- 25 Der Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS Pgro metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA, , pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA, pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA , pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA und pCLiK5MCS Pgro 1701/1834 nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene
- 30 Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.
- 35 C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium (40 g/l Saccharose, 20 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l K₂HPO₄, 0,25g/l MgSO₄ x 7H₂O, 54 g Aces, 1 ml CaCl₂ (10 g/l), 1 ml Protocatechuat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l FeSO₄ x /H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 2 g/l
- 40

ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄, 0,02 g/l NiCl₂ x 6 H₂O), 100 µg/l Vitamin B₁₂, 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C für 5 h angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die

5 Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Riboly-

10 serröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsan-

15 sätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl₂, 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zellex-

trakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufge-

nommen.

20 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a gezeigt.

Tabelle 2a

Stamm	spezifische Aktivität [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	7,5
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro metA	109,0
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1828 metA	30,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1831 metA	8,7
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1832 metA	60,6
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1833 metA	217,3
ATCC 13032 pCLiK5MCS Pgro 1701/1835 metA	96,3

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
 - 5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
 - 10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
 - D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)zur Transkription von Genen.
- 15 2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
 - E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
 - 25 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
 - G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
 - 30 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 35 5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
 - A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
 - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

- auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
- 5 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),
- mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1
ausgenommen ist.
- 10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.
- 15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend
- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),
- mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2
25 ausgenommen ist.
8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
- 30 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 35 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 10 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 35 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

- 5 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 10
- 15 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 35 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 5 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 10 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 20 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 25 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 30 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 40 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30
- 35 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus ein-
5 bringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass
10 die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Prote-
15 in aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen,
20 Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

5 Synthase, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

10

20. Expressionskassette, umfassend

- a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- 15 b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

20 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

- 25 21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren,
- 30 Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen
- 35

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22.
24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

- 5 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 10 25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30
- 35 26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass
- 40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40

- 5
br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 10
29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- 15
c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 20
d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 25
30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 30
d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 35
d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit reduzierter Expressionsrate von mindetstens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

- 5 37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, 15 Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige 20 Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, 25 Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 30 38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.
- 35 39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- 40

- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Deydrognease, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrognease, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Deydrognease-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrognease-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

- Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.
- 5
42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-
- 40

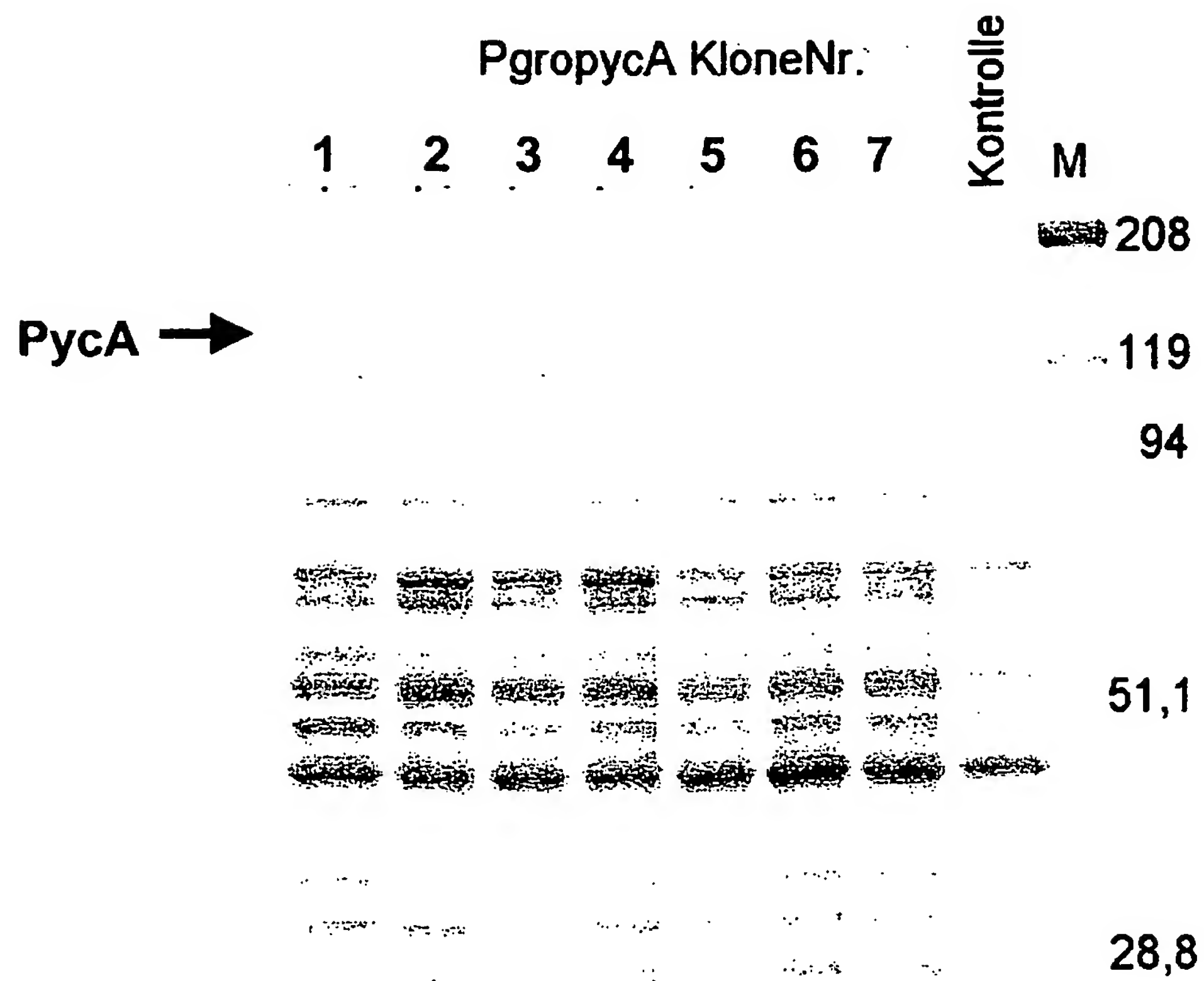
- moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.
44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, , Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend

- 5 einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase
- 10 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, 15 Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 20 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase' und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.
- 25 47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, 30 Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität , Ketol-Aid-Reductoisomerase- Aktivität, Branched chain aminotransferase- Aktivität, Coenzym B12-abhängige 35 Methionin Synthase- Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase- Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
- 40 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-

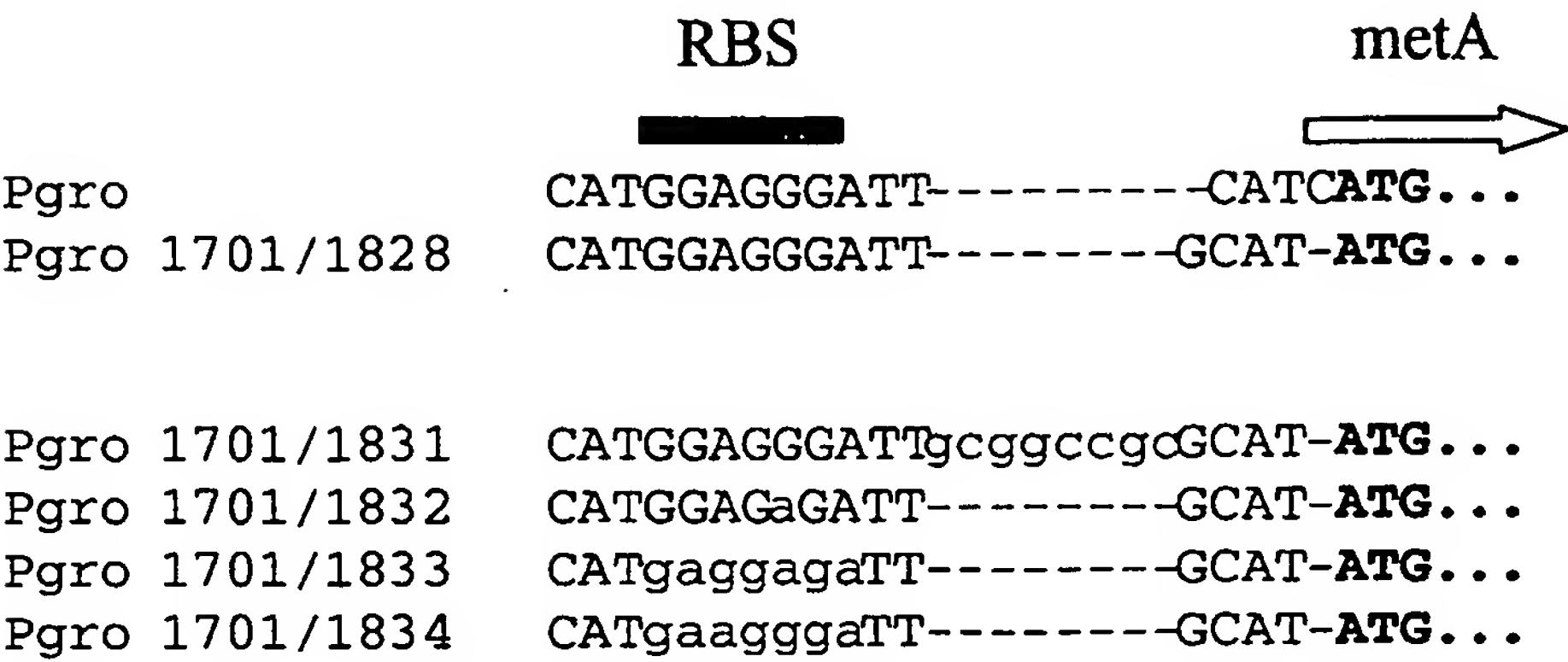
schrittes aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

- 5 49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 10 50. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 15 51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53.
52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 53. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
- 20 53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 52.
- 25 54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NO. 52 als -10-Region verwendet wird.

Figur 1



Figur 2



SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Pgro-Expressionseinheiten

<130> PF 55184/Mec

10 <160> 53

<210> 1

<211> 164

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>

<223> SEQ_ID_1_GROES_RXA00497_PROMOTOR

20 <400> 1

cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60

tctcgggggt agagtgccaa ataggttggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120

ctgtgctgga aaccacaaac cggcacacac aaaatttttc tcat 164

25 <210> 2

<211> 177

<212> DNA

30 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_2_GROES_RXA00497_GESAMTE_EXPRESSIONSEINHEIT

35 <400> 2

cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac 60

tctcgggggt agagtgccaa ataggttggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg 120

40 ctgtgctgga aaccacaaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg attcatc 177

<210> 3

<211> 1365

45 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_3_RXA00077

50 <400> 3

atgaatgatg agaattttca aagctccaac tatcagccat tcccagagttt tgacgattgg 60

55 aaacagatcg aggtgtcgct cttagatgtc atcgaatcct cagccattt ttctgatttg 120

aaagatagca ctgatcggtc tgcgtagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180

gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt taccataca 240

60 gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300

cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360

actccaatct ctacgaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420

65 agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480

aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540

gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
 5 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720
 cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
 10 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
 actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaate tggttcggct 900
 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
 15 aggtcccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
 aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcgggt cccattcaa tctgccagag 1080
 20 ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgacctag ctttcaatag caactctcca 1140
 aaacaaatct tccaccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
 25 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
 gatcattct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

30

<210> 4
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

35

<400> 4

Met Asn Asp Glu Asn Ile Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Pro Phe Pro Ser
 1 5 10 15
 40 Phe Asp Asp Trp Lys Gln Ile Glu Val Ser Leu Leu Asp Val Ile Glu
 20 25 30
 45 Ser Ser Arg His Phe Ser Asp Leu Lys Asp Ser Thr Asp Arg Ser Ala
 35 40 45
 Leu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Ala Ala Ala Val Asp Thr
 50 55 60
 50 Asn Ala Ile Glu Gly Ile Phe Gln Thr Asp Arg Gly Phe Thr His Thr
 65 70 75 80
 Val Ala Thr Gln Val Gly Ala Trp Glu Gln Gln Met Ala Met Lys Gly
 85 90 95
 55 Lys His Val Lys Pro Ala Phe Asp Asp Thr Leu Glu Gly Phe Glu Tyr
 100 105 110
 60 Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile
 115 120 125
 Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val
 130 135 140
 65 Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr
 145 150 155 160

Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala

3

	165	170	175
	Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser		
	180	185	190
5	Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala		
	195	200	205
	Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly		
10	210	215	220
	Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp		
	225	230	235
15	Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile		
	245	250	255
	His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg		
20	260	265	270
	Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp		
	275	280	285
	Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp		
25	290	295	300
	Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His		
	305	310	315
30	Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu		
	325	330	335
	Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile		
35	340	345	350
	Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser		
	355	360	365
	Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe		
40	370	375	380
	His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser		
	385	390	395
45	Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr		
	405	410	415
	Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val		
50	420	425	430
	Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala		
	435	440	445
55	Lys Lys Phe Gln Gln Asn		
	450		
	<210> 5		
	<211> 19		
60	<212> DNA		
	<213> Corynebacterium glutamicum		
	<220>		
	<223> SEQ_ID_5_GRO3		
65	<400> 5		
	gccgcagcaa acccagtag		

5 <210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_6_GRO11

10 <400> 6
agtcgacacg atgaatccct ccatgagaaa a 31

15 <210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_7_PYC6

<400> 7
tttttctcat ggagggattc atcgtgtcga ctcacacatc ttcaacgctt ccag 54

25 <210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>
<223> SEQ_ID_8_PYC3

<400> 8
35 cccgcagcaa cgcacgcaag aaa 23

40 <210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

45 <220>
<223> SEQ_ID_9_GRO12

<400> 9
gcattcgcg cgcctcgtaac ta 22

50 <210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

55 <220>
<223> SEQ_ID_10_PYC11

<400> 10
60 gggtcccgcg ccctggtaa 19

65 <210> 11
<211> 5720
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_11_PK19_MOB_SACB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (562) .. (1356)
 5 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1385) .. (1847)
 10 <223> PsacB

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1848) .. (3266)
 15 <223> SacB

<400> 11
 ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac 60
 20 gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt 120
 tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180
 25 gcctgaatgg cgaatggcga taagctagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240
 ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtcgc agaaacggtg ctgaccccg 300
 atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag 360
 30 gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc 420
 gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac 480
 35 tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag 540
 acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600
 gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 660
 40 gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccgggtt tttttgtcaa gaccgacctg 720
 tccggtgccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg 780
 45 ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
 ttgggcgaag tgccggggca gcatctcctg tcattctacc ttgctcctgc cgagaaagta 900
 tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtg catagcttg atccggctac ctgcccattc 960
 50 gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc 1020
 gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gtccgccagg 1080
 55 ctcaaggcgc ggatgcccga cggcgaggat ctctcgtga cccatggcga tgcctgcttg 1140
 ccgaatatca tgggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 1200
 gtggcgacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga agagcttggc 1260
 60 ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccg ttcgcagcgc 1320
 atcgcccttct atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttccgctagag 1380
 65 gatcgatcct ttttaacca tcacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440
 atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgcccat gcaacagaaa 1500
 ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt tttagttctt taggcccgtg 1560

gtctgcaaat ccttttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620
ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga aaagtaaate gcgcgggttt gttactgata 1680
5 aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac 1740
atatttttagg tcttttttta ttgtgcgtaa ctaacttgcc atcttcaaac aggagggctg 1800
10 gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa 1920
ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc 1980
15 atattacacg ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040
tttctgaatt tgattcgtec acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt 2100
20 gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcaactgtgc aaactatcac ggctaccaca 2160
tcgtctttgc attagccgga gacctaataa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220
atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaaaag 2280
25 acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccggtg 2400
30 aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460
ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520
atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctcaggcgac aaccatacgc 2580
35 tgagagatcc tcaactacgta gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaca 2640
ctggaactga agatggctac caaggcgaag aatctttatt taacaaagca tactatggca 2700
40 aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca 2760
cggctgagtt agcaaacggc gctctcggtg tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820
aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880
45 acgtctttaa aatgaacggc aaatggtacc tgttcactga ctcccgcgga tcaaaaatga 2940
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa 3000
50 ctggcccata caagccgctg aacaaaactg gccttggtgtt aaaaatggat cttgatccta 3060
acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg 3120
tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180
55 cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg 3240
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tgggtaccga 3300
60 gcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 3360
ccttctatga aagggtgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccctcgcg gacgtgctca 3420
tagtccacga cgcccgatg tttgtagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480
65 ctcatgccgg ccgcccgcgc ctttctctca atcgctcttc gttcgtctgg aaggcagtac 3540
accttgatag gtgggctgcc cttcttggtt ggcttggttt catcagccat ccgcttgccc 3600

tcattctgtta cgccggcggt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660
5 gccagggtgcg aataagggac agtgaagaag gaacacccgc tcgcgggtgg gcctacttca 3720
cctatcctgc ccggctgacg ccgttggata caccaaggaa agtctacacg aaccctttgg 3780
caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840
10 ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagcgc tgcttccctg ctgttttgtg gaatatctac 3900
cgactggaaa caggcaaattg caggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgatg 3960
ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc 4020
15 attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080
ggcccagggc ttcccgggtat caacaggggac accaggattt atttattctg cgaagtgate 4140
20 ttccgtcaca ggtattttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat 4200
ttagtgatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agctcctgaa 4260
aatctcgata actcaaaaaa tacgcccgggt agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg 4320
25 gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380
gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 4440
30 tattcggcgc aaagtgcgtc gggtagtgct gccaaacttac tgatttagtg tatgatggtg 4500
tttttgaggt gctccagtgg cttctgtttc tatcagggtt ggatgatcct ccagcgcggg 4560
gatctcatgc tggagtctct cgcccacccc aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 4620
35 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgtg 4680
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740
40 acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgcccg atcaagagct accaactctt 4800
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4920
45 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4980
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtt gtgcacacag 5040
50 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100
agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggtaaagcg cagggtcggg 5160
acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5220
55 ggggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 5280
ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 5340
60 gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5460
gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5520
65 tgcagctggc acgacaggtt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5580
gtgagttagc tcaactatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 5640

```

      ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
5      gccaaagcttg catgcctgca                                     5720

      <210> 12
      <211> 24
      <212> DNA
10     <213> Corynebacterium glutamicum

      <220>
      <223> SEQ_ID_12_PYC14

15     <400> 12
      ccggcgaagt gtctgctcgc gtga                                     24

      <210> 13
20     <211> 18
      <212> DNA
      <213> Corynebacterium glutamicum

      <220>
25     <223> SEQ_ID_13_PYC15

      <400> 13
      accccgcccc agtttttc                                     18

30     <210> 14
      <211> 7438
      <212> DNA
      <213> Corynebacterium glutamicum
35     <220>
      <223> SEQ_ID_14_PK19_MOB

      <220>
40     <221> misc_feature
      <222> (1 )..(1422 )
      <223> SacB complement

      <220>
45     <221> misc_feature
      <222> (1423 )..(1885 )
      <223> PsacB complement

      <220>
50     <221> misc_feature
      <222> (1914 )..(2708 )
      <223> KanR

      <220>
55     <221> misc_feature
      <222> (3118 )..(3622 )
      <223> 5' pycA

      <220>
60     <221> misc_feature
      <222> (3863 )..(4039 )
      <223> Pgro

      <220>
65     <221> misc_feature
      <222> (4040 )..(4888 )
      <223> Teil pycA

```

<400> 14
ttatttggtta actgttaatt gtccttggtc aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt 60
cttgcccttg atgttcagca ggaagctcgg cgcaaacgtt gattgtttgt ctgcgtagaa 120
5 tcctctgttt gtcatatagc ttgtaatcac gacattgttt cctttcgctt gaggtacagc 180
gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcggt aggatcaaga tccattttta acacaaggcc 240
10 agttttgttc agcggcttgt atgggccagt taaagaatta gaaacataac caagcatgta 300
aatatcggtta gacgtaatgc cgtcaatcgt catttttgat ccgcgggagt cagtgaacag 360
15 gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt cgcgcggttca atttcatctg ttactgtgtt 420
agatgcaatc agcggtttca tcactttttt cagtgtgtaa tcatcgttta gctcaatcat 480
accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta tcgctttgca gaagtttttg 540
20 actttcttga cggaagaatg atgtgctttt gccatagtat gctttgttaa ataaagattc 600
ttcgcccttg tagccatctt cagttccagt gtttgcttca aatactaagt atttgtggcc 660
tttatcttct acgtagttag gatctctcag cgtatggttg tcgcctgagc tgtagttagc 720
25 ttcacgatg aactgctgta cattttgata cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt 780
ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc 840
30 agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt accggagaaa tcagtgtaga ataaacggat 900
ttttccgtca gatgtaaagtg tggctgaacc tgaccattct tgtgtttggt cttttaggat 960
agaatcattt gcatcgaatt tgctcgtgtc tttaaagacg cggccagcgt ttttccagct 1020
35 gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt 1080
tttaggatct ccggctaagc caaagacgat gtggtagccg tgatagtttg cgacagtgcc 1140
40 gtcagcgttt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg ccttttgtag aagagatatt 1200
tttaattgtg gacgaatcaa attcaggaac ttgatatatt tcattttttt gctgttcagg 1260
gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg tatgtttcct tatatggctt 1320
45 ttggttcgtt tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct gccagcagtg cggtagtaaa 1380
ggttaatact gttgcttggt ttgcaaactt tttgatgttc atcgttcatg tctccttttt 1440
50 tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt 1500
tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga cgccaaagta tacactttgc 1560
cctttacaca ttttaggtct tgcttgcttt atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt 1620
55 cgacctcatt ctattagact ctcgtttgga ttgcaactgg tctattttcc tcttttggtt 1680
gatagaaaat cataaaagga tttgcagact acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg 1740
60 tttcttttca ttctctgtat tttttatagt ttctgttgca tgggcataaa gttgcctttt 1800
taatcacaat tcagaaaata tcataatctc tcatttcact aaataatagt gaacggcagg 1860
tatatgtgat gggttaaaaa ggatcgatcc tctagcgaac ccagagtcc cgctcagaag 1920
65 aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa 1980
agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagctctt cagcaatctc acgggtagcc 2040

aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa 2100
5 aagcggccat tttccacat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga 2160
tcctcgccgt cgggcatccg cgccttgagc ctggcgaaca gtccggctgg cgcgagcccc 2220
tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct 2280
10 cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc 2340
agccgcccga ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac 2400
aggagatcct gccccggcac ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca 2460
15 acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc 2520
tcgtcttgga gttcattcag ggcaccggac aggtcggctt tgacaaaaag aaccggggcg 2580
20 ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag 2640
tcatagccga atagcctctc caccgaagcg gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt 2700
tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat 2760
25 cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca 2820
gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc 2880
30 tatcgccatg taagccact gcaagctacc tgccttctct ttgcgcttgc gttttccctt 2940
gtccagatag cccagtagct gacattcatc cggggtcagc accgtttctg cggactggct 3000
ttctacgtgt tccgcttcc ttagcagccc ttgcgccctg agtgcttgcg gcagcgtgaa 3060
35 gctagatgca tgctcgagcg gccgccagtg tgatggatat ctgcagaatt cgcccttccg 3120
gcgaagtgtc tgctcgcggtg attgtgcttc ctttggctac taaccacgc gccaatatgc 3180
40 gttccctgcg ccacggtttt gtgaagctgt tctgccgcg taactctggc ctgatcatcg 3240
gtggtgtcgt ggtggcaccg accgcgtctg agctgaccc accgatcgct gtggcagtga 3300
ccaaccgtct gacagttgct gatctggctg atacctcgc ggtgtacca tcattgtcag 3360
45 gttcgattac tgaagcagca cgtcagctgg ttcaacatga tgatctaggc taatttttct 3420
gagtcttaga ttttgagaaa acccaggatt gctttgtgca ctctggggtt ttcactttgt 3480
50 taagcagttt tggggaaaag tgcaaagttt gcaaagttta gaaatatttt aagaggtaag 3540
atgtctgcag gtggaagcgt ttaaagcgt taaacttggc caaatgtggc aacctttgca 3600
aggtgaaaaa ctggggcggg gtaagggcga attccagcac actggcgggc gttactagct 3660
55 tatcgccatt cgccattcag gctgcgcaac tggtgggaag ggcgatcggt gcgggcctct 3720
tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 3780
60 ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcaa cctgtggcgc 3840
aacgctgtat ataacctgcg tacggcttaa agtttggtg ccatgtgaat ttttagcacc 3900
ctcaacagtt gagtgctggc actctcgggg gtagagtgcc aaatagggtg tttgacacac 3960
65 agttgttcac ccgcgacgac ggctgtgctg gaaaccaca accggcacac acaaaatttt 4020
tctcatggag ggattcatcg tgtcgactca cacatcttca acgcttccag cattcaaaaa 4080

gatcttggta gcaaaccgcg gcgaaatcgc ggtccgtgct ttccgtgcag cactcgaaac 4140
5 cgggtgcagcc acggtagcta ttacccccg tgaagatcgg ggatcattcc accgctcttt 4200
tgcttctgaa gctgtccgca ttggtaccga aggtcacca gtcaaggcgt acctggacat 4260
cgatgaaatt atcgggtgcag ctaaaaaagt taaagcagat gccatttacc cgggatacgg 4320
10 ctctctgtct gaaaatgccc agcttgccccg cgagtgtgcg gaaaacggca ttacttttat 4380
tggcccaacc ccagagggtc ttgatctcac cggtgataag tctcgcgcgg taaccgcccgc 4440
gaagaaggct ggtctgccag ttttggcgga atccaccccc agcaaaaaca tcgatgagat 4500
15 cgtaaaaagc gctgaaggcc agacttacct catctttgtg aaggcagttg ccggtggtgg 4560
cggacgcggt atgcgttttg ttgcttcacc tgatgagctt cgcaaattag caacagaagc 4620
20 atctcgtgaa gctgaagcgg ctttcggcga tggcgcggta tatgtcgaaac gtgctgtgat 4680
taaccctcag catattgaag tgcagatcct tggcgatcac actggagaag ttgtacacct 4740
ttatgaacgt gactgctcac tgcagcgtcg tcacaaaaa gttgtcgaaa ttgcgccagc 4800
25 acagcatttg gatccagaac tgcgtgatcg ctttgtgcg gatgcagtaa agttctgccg 4860
ctccattggt taccagggcg cgggaaccaa gggcgaattc ctctggataa tcatcgcggt 4920
30 agttacgagc ggcgcgaatg caagggcgaa ttcgagctcg gtaccggggg atcctctaga 4980
gtcgacctgc aggcattgcaa gcttggcgta atcatggta tagctgtttc ctgtgtgaaa 5040
ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 5100
35 ggggtgcctaa tgagtgaagt aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 5160
gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 5220
40 tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcggttcg 5280
gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 5340
ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 5400
45 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 5460
acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 5520
50 tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc 5580
ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 5640
gggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 5700
55 ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 5760
actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 5820
60 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc 5880
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac 5940
caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 6000
65 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaaactc 6060
acgttaaggg attttgggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttggg 6120

gtgggcgaag aactccagca tgagatcccc gcgctggagg atcatccagc cctgatagaa 6180
5 acagaagcca ctggagcacc tcaaaaacac catcatacac taaatcagta agttggcagc 6240
atcacccgac gcactttgcg ccgaataaat acctgtgacg gaagatcact tcgcagaata 6300
aataaatcct ggtgtccctg ttgataccgg gaagccctgg gccaaactttt ggcgaaaatg 6360
10 agacgttgat cggcacgtaa gaggttccaa ctttcacccat aatgaaataa gatcactacc 6420
gggcgtatatt tttgagttat cgagattttc aggagctgat agaaacagaa gccactggag 6480
cacctcaaaa acaccatcat aactaaatc agtaagttgg cagcatcacc cgacgcactt 6540
15 tgcgccgaat aaatacctgt gacggaagat cacttcgcag aataaataaa tcctggtgtc 6600
cctgttgata ccgggaagcc ctgggccaac ttttggcgaa aatgagacgt tgatcggcac 6660
20 gtaagagggtt ccaactttca ccataatgaa ataagatcac taccgggctg attttttgag 6720
ttatcgagat tttcaggagc tctttggcat cgtctctcgc ctgtccctc agttcagtaa 6780
tttcctgcat ttgcctgttt ccagtcggta gatattccac aaaacagcag ggaagcagcg 6840
25 cttttccgct gcataaccct gcttcggggg cattatagcg attttttcgg tatatccatc 6900
ctttttcgca cgatatacag gattttgcca aagggttcgt gtagactttc cttggtgtat 6960
30 ccaacggcgt cagccgggca ggatagggtga agtaggcca cccgcgagcg ggtgttcctt 7020
cttcactgtc cttattcgc acctggcggg gctcaacggg aatcctgctc tgcgaggctg 7080
gccggctacc gccggcgtaa cagatgaggg caagcggatg gctgatgaaa ccaagccaac 7140
35 caggaagggc agcccaccta tcaaggtgta ctgccttcca gacgaacgaa gagcgattga 7200
ggaaaaggcg gcggcgccg gcatgagcct gtcggcctac ctgctggccg tcggccaggg 7260
40 ctacaâaate acgggcgtcg tggactatga gcacgtccgc gagggcgctc cggaâaacga 7320
ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaate gaaatctcgt gatggcaggt 7380
tgggcgctcg ttggtcggtc atttcgctcg gtacccatcg gcattttctt ttgcgttt 7438
45

<210> 15
<211> 52
<212> DNA
50 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_15

55 <400> 15
cccgggatcc gctagcggcg cgcgggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

60 <210> 16
<211> 53
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

65 <220>
<223> SEQ_ID_16

<400> 16
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

5 <210> 17
<211> 47
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>
<223> SEQ_ID_17

<400> 17
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

15 <210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_18

<400> 18
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

25 <210> 19
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>
<223> SEQ_ID_19

<400> 19
gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgttcg tgaa 34

35 <210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

40 <220>
<223> SEQ_ID_20

<400> 20
gagagggcgg ccgctcaagt cggcgaagcc acgc 34

45 <210> 21
<211> 140
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>
<223> SEQ_ID_21

<400> 21
tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60
tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcy ttaattaaca attgggatcc 120
tctagaccgc ggattttaa 140

55 <210> 22
<211> 140

<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

5 <220>
<223> SEQ_ID_22

<400> 22
gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60
10 tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120
aggcctctcg agatttaa at 140

15 <210> 23
<211> 5091
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_23_PCLIK5MCS

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (469)..(1260)
<223> KanR

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (1527)..(2387)
<223> Ori EC(pMB) complement

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (2533)..(3207)
<223> Orf1

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (3541)..(4662)
<223> Rep Protein

<400> 23
45 tctgattaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
cggacctagg gatatcgctc acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggaccc 120
ctagaccggg gatttaaata gctagcgggc tgctaaagga agcggaacac gtagaaagcc 180
50 agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta 300
gactgggagg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360
55 aaggttggga agccctgcaa agtaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 480
60 gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg 600
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660
65 gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttggt 720
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggccaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780

tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900
5 cgtactcgga tggagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960
ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgcgag cgaggatctc 1020
10 gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140
15 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac 1200
ggatcgcgcg ctcccgattc gcagcgcacg gccttctatc gccttcttga cgagtctctc 1260
tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccacactg ccatcacgag 1320
20 atttcgattc caccgccgcg ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg 1380
ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
gcgcgccggc cggcccgggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1500
25 aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1560
gcggtatcag ctcaactcaa ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
30 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggagctcc 1800
35 ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
tcgggaagcg tggcgcttct tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
40 gttecgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctt agcccgaccg ctgcgcctta 1980
tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
45 tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctgg 2220
50 agcgggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa 2280
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaagg 2340
attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ggccggccgc 2400
55 ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccg gtgattttcc gccaaaaact 2460
ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
60 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700
65 ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggcggcg 2820

gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880
5 cacgccgagg agctggaggg ggctaggctc caaatggcgc tggaaagtgcg tcccccgagc 2940
gaaatttttg ccatggctcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgacgtg 3000
gcggtgcccc caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
10 aggacgtgtc agcgcgcga ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgtc 3240
15 aaaaatgact ctacgagatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
tctgttcgac acccatcccc agctcgcgt gcgacacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
20 ccgcgaattc ctgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
cgccagcgtc tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
ggttcaaaat cgcttgcccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540
25 gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600
aaccgccagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
30 atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
acccgcgttt tcggcgtga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg ccactgcact 3840
35 ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900
gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960
40 caggagtttt ctacgagcgc ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgcgc ctgaagcgtc tggagagctg 4080
atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccaggggcgtg ccgcccgtga tgagacggct 4140
45 tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260
50 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320
ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
55 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcagggtg gtttatgact 4560
60 gttgaggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
65 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860

caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920
cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
5 tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
gcgtcggtgc cgctgggtgc gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

10
<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

15
<220>
<223> SEQ_ID_24

20
<400> 24
gcgcggtacc tagactcacc ccagtgc 28

25
<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

30
<220>
<223> SEQ_ID_25
<400> 25
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

35
<210> 26
<211> 6349
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

40
<220>
<223> SEQ_ID_26_PCLIK5MCS_PMETA_META

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(1311)
<223> metA

55
<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

60
<220>
<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

65
<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-Ec (pMB) complement
<220>

<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep Protein

5 <400> 26
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag ctagactcac cccagtgttt 60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
10 tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccaccag aacaggcggg tattttcatg 180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240
15 gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420
20 tgcgtgatct gtaccaacgt catcgggtgg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc tccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggg 600
25 ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggcccga tgtaccaga aactgttggc 660
gcagctgctg ttcttgcaat ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatacg cattcaatcc 720
30 gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900
35 ggtccctacc gcaagcccga ccagcgttc gccgtggaat cctacttggg ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcgttt cgacgccggc tctacgtct tgetcaccga cgccctcaac 1020
40 cgccacgaca ttggtcgcga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgtcggccac 1200
45 gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaaact cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagtctg 1320
50 gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agaccgggga tttaaatacg tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt agaaagccag 1440
55 tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
60 ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctcgatga ttgaacaaga 1740
tggaattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800
65 acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920

g c g g c t a t c g t g g c t g g c c a c g a c g g g c g t t c c t t g c g c a g c t g t g c t c g a c g t t g t c a c 1980
5 t g a a g c g g g a a g g g a c t g g c t g c t a t t g g g c g a a g t g c c g g g c a g g a t c t c c t g t c a t c 2040
t c a c c t t g c t c c t g c c g a g a a a g t a t c c a t c a t g g c t g a t g c a a t g c g g c g g c t g c a t a c 2100
g c t t g a t c c g g c t a c c t g c c c a t t c g a c c a c c a a g c g a a a c a t c g c a t c g a g c a g c a c g 2160
10 t a c t c g g a t g g a a g c c g g t c t t g t c g a t c a g g a t g a t c t g g a c g a a g a g c a t c a g g g g c t 2220
c g c g c c a g c c g a a c t g t t c g c c a g g c t c a a g g c g c g a t g c c c g a c g g c g a g g a t c t c g t 2280
c g t g a c c c a t g g c g a t g c c t g c t t g c c g a a t a t c a t g g t g g a a a a t g g c c g c t t t t c t g g 2340
15 a t t c a t c g a c t g t g g c c g g c t g g g t g t g g c g g a c c g c t a t c a g g a c a t a g c g t t g g c t a c 2400
c c g t g a t a t t g c t g a a g a g c t t g g c g g c g a a t g g g c t g a c c g c t t c c t c g t g c t t t a c g g 2460
20 t a t c g c c g c t c c c g a t t c g c a g c g c a t c g c c t t c t a t c g c c t t c t t g a c g a g t t c t t c t g 2520
a g c g g g a c t c t g g g g t t c g a a a t g a c c g a c c a a g c g a c g c c c a a c c t g c c a t c a c g a g a t 2580
t t c g a t t c c a c c g c c g c c t t c t a t g a a a g g t t g g g c t t c g g a a t c g t t t t c c g g g a c g c c 2640
25 g g c t g g a t g a t c c t c c a g c g c g g g g a t c t c a t g c t g g a g t t c t t c g c c c a c g c t a g c g g c 2700
g c g c c g g c c g g c c c g g t g t g a a a t a c c g c a c a t g a t g c g t a a g g a g a a a t a c c g c a t c a g 2760
30 g c g c t c t t c c g c t t c c t c g c t c a c t g a c t c g c t g c g c t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c 2820
g g t a t c a g c t c a c t c a a a g g c g g t a a t a c g g t t a t c c a c a g a a t c a g g g a t a a c g c a g g 2880
a a a g a a c a t g t g a g c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g a a a a g g c c g c g t t g c t 2940
35 g g c g t t t t t c a t a g g c t c c g c c c c c t g a c g a g c a t c a c a a a a t c g a c g c t a a g t c a 3000
g a g g t g g c g a a a c c c g a c a g g a c t a t a a a g a t a c c a g g c g t t t c c c c c t g g a a g c t c c c t 3060
40 c g t g c g c t c t c c t g t t c c g a c c c t g c c g c t t a c c g g a t a c c t g t c c g c c t t t c t c c c t t c 3120
g g g a a g c g t g g c g c t t t c t c a t a g c t c a c g c t g t a g g t a t c t c a g t t c g g t g t a g g t c g t 3180
t c g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a c c c c c g t t c a g c c c g a c c g c t g c g c c t t a t c 3240
45 c g g t a a c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a g a c a c g a c t t a t c g c c a c t g g c a g c a g c 3300
c a c t g g t a a c a g g a t t a g c a g a c g a g g t a t g t a g g c g g t g c t a c a g a g t t c t t g a a g t g 3360
50 g t g g c c t a a c t a c g g c t a c a c t a g a a g g a c a g t a t t t g g t a t c t g c g c t c t g c t g a a g c c 3420
a g t t a c c t t c g g a a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a c c g c t g g t a g 3480
c g g t g g t t t t t t t g t t t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a g g a t c t c a a g a a g a 3540
55 t c c t t t g a t c t t t t c t a c g g g t c t g a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g a t 3600
t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a a g g a t c t t c a c c t a g a t c c t t t t a a a g g c c g g c c g c g g 3660
60 c c g c g c a a a g t c c c g c t t c g t g a a a a t t t t c g t g c c g c g t g a t t t t c c g c c a a a a a c t t t 3720
a a c g a a c g t t c g t t a t a a t g g t g t c a t g a c c t t c a c g a c g a a g t a c t a a a a t t g g c c c g a 3780
a t c a t c a g c t a t g g a t c t c t c t g a t g t c g c g c t g g a g t c c g a c g c g c t c g a t g c t g c c g t 3840
65 c g a t t t a a a a a c g g t g a t c g g a t t t t t c c g a g c t c t c g a t a c g a c g g a c g c g c c a g c a t c 3900
a c g a g a c t g g g c c a g t g c c g c g a g c g a c c t a g a a a c t c t c g t g g c g g a t c t t g a g g a g c t 3960

ggctgacgag ctgctgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
5 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcgc 4080
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgccca acaaacgccca 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
10 aattttggcc atggctgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260
ggtgcccgcga ggcatgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgcgtt ggccgcccag 4320
15 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380
cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa 4500
20 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac 4560
tgttcgacac ccatcccgag ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620
gcgaattcct cgctcacctg ggagagaaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
25 ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
30 gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
35 cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatgac cgggtgatgc 4980
cgacgcagcg atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgtgacc aggttttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
40 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280
45 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgatg agacggcttt 5400
50 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460
caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520
55 tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700
60 gaaagaccca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 5820
65 tgaggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttccccg gtagggtctc 6000

tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
5 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6120
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240
10 gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300
gtcggtgccg ctgggtgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

15 <210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_27

25 <400> 27
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

30 <210> 28
<211> 41
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_28

35 <400> 28
cctgaaggcg cgagggtggg catgatgaat ccctccatga g 41

40 <210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

45 <220>
<223> SEQ_ID_29

<400> 29
cccaccctcg cgccttcag 19

50 <210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

55 <220>
<223> SEQ_ID_30

60 <400> 30
ctgggtacat tgcggccc 18

65 <210> 31
<211> 6372
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

```

<223> SEQ_ID_31_PCLIK5MCS_PGROESMETA

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (3 )..(179 )
   <223> Pgro

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (180 )..(1313 )
   <223> meta

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1735 )..(2526 )
   <223> KanR

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (2793 )..(3653 )
   <223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (3799 )..(4473 )
   <223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (4807 )..(5928 )
   <223> Rep Protein

<400> 31
35 agcggcttaa agtttggctg ccatgtgaat ttttagcacc ctcaacagtt gagtgtctggc 60
   actctcgggg gtagagtgcc aaatagggtg tttgacacac agttgttcac ccgcgacgac 120
   ggctgtgctg gaaaccacac accggcacac acaaaatttt tctcatggag ggattcatca 180
40 tgcccaccct cgcgccttca ggtcaacttg aaatccaagc gatcggtgat gtctccaccg 240
   aagccggagc aatcattaca aacgctgaaa tcgcctatca ccgctggggg gaataccgcg 300
   tagataaaga aggacgcagc aatgtcgttc tcatcgaaca cgccctcact ggagattcca 360
45 acgcagccga ttggtgggct gacttgctcg gtcccggcaa agccatcaac actgatattt 420
   actgcgtgat ctgtaccaac gtcatcggtg gttgcaacgg ttccaccgga cctggctcca 480
50 tgcattcaga tggaaatttc tggggtaatc gtttccccgc cacgtccatt cgtgatcagg 540
   taaacgccga aaaacaattc ctgcagcac tcggcatcac cacggtcgcc gcagtacttg 600
   gtggttccat ggggtggtgcc cgcaccctag agtgggccgc aatgtacca gaaactgttg 660
55 gcgcagctgc tgttcttgca gtttctgcac gcgccagcgc ctggcaaate ggcattcaat 720
   ccgccc aaat taaggcgatt gaaaacgacc accactggca cgaaggcaac tactacgaat 780
60 ccggctgcaa ccagccacc ggactcggcg ccgccgacg catcgccac ctacactacc 840
   gtggcgaact agaaatcgac gaacgcttcg gcaccaaagc ccaaagaac gaaaaccac 900
   tcggtcccta ccgcaagccc gaccagcgt tcgccgtgga atcctacttg gactaccaag 960
65 cagacaagct agtacagcgt ttcgacgccg gtcctacgt cttgctcacc gacgccctca 1020
   accgccacga cattggtcgc gaccgcggag gcctcaaca ggactcgaa tccatcaaag 1080

```

ttccagtcct tgcgcaggc gtagataccg atatTTTTgta CCCtaccac cagcaagaac 1140
5 acctctccag aaacctggga aatctactgg caatggcaaa aatcgtatcc cctgtcggcc 1200
acgatgcttt cctcaccgaa agccgccaaa tggatcgcac cgtgaggaaac ttcttcagcc 1260
tcctctcccc agacgaagac aaccttcga cctacatcga gttctacatc taacatatga 1320
10 ctagttcgga cctagggata tcgtcgacac cgatgctctt ctgctgtaac taacaattgg 1380
gacctctag acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag 1440
15 aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg 1500
acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct tacatggcga 1560
tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc 1620
20 tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaaggatc 1680
tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt tcgcatgatt 1740
gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat 1800
25 gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc tgttccggct gtcagcgag 1860
gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac 1920
30 gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac 1980
gttgctactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag aagtgccggg gcaggatctc 2040
35 ctgtcatctc accttgcctc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg 2100
ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag 2160
cgagcacgta ctcgatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat 2220
40 caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggtcgaagg cgcgcatgcc cgacggcgag 2280
gatctcgctg tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga aaatggccgc 2340
45 ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg 2400
ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg ctctctcgctg 2460
ctttacggta tcgccgctcc cgattcgag cgcacgcct tctatgcct tcttgacgag 2520
50 ttcttctgag cgggactctg ggggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat 2580
cacgagatct cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc 2640
55 gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagtcc ttcgcccacg 2700
ctagcggcgc gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 2760
cgcatcaggc gctcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg 2820
60 cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat 2880
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 2940
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 3000
65 tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 3060
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 3120

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg 3180
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 3240
5 gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 3300
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 3360
10 ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 3420
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 3480
gctggtagcg gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 3540
15 caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 3600
taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc 3660
20 ggccgcggcc gcgcaaagtc ccgcttcgtg aaaattttcg tgccgcgtga ttttcgccca 3720
aaaactttta cgaacgttcg ttataatggg gtcacgacct tcacgacgaa gtactaaaat 3780
tgcccccgaat catcagctat ggatctctct gatgtcgcgc tggagtccga cgcgctcgat 3840
25 gctgccgtcg atttaaaaac ggtgatcgga tttttccgag ctctcgatac gacggacgcg 3900
ccagcatcac gagactgggc cagtgccgcg agcgacctag aaactctcgt ggcggtatctt 3960
30 gaggagctgg ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgccag gaggacgcac agtagtggag 4020
gatgcaatca gttgcgcta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga 4080
cgccgcgcaa aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcgccaac 4140
35 aaacgccacg ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctgga agtgcgtccc 4200
ccgagcgaaa ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag aattatcgcg 4260
40 atcgtggcgg tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaagc ccgcgtttcg tgtgccgtgg 4320
ccgcccagga cgtgtcagcg ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt 4380
cgaaaaagcg cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa 4440
45 cgccccgtga gcggtaactc acagggcgct ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa 4500
gcgctcaaaa atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct ggaaattttc 4560
50 cgctgatctg ttcgacaccc atcccagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga 4620
agaccgccgc gaattcctcg ctacactggg cagagaaaat ttccagggca gcaagaccgc 4680
cgacttcgcc agcgcttgga tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac 4740
55 cgagttgggt caaaatcgct tgcccgggtg cagtatgttg ctctgacgca cgcgcagcac 4800
gcagccgtgc ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag 4860
60 cacgtaaacc ccgaggtcta cgcgattttg gagcgctggg cacgcctgga aaaagcgcca 4920
gcttggatcg gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcactctggct cattgatccg 4980
gtgtatgccg cagcagggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctggctgc aacgaccgag 5040
65 gaaatgaccc gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag ccgtggccac 5100
tgcactctcc gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc 5160

ctagctgatac ttatggaggt tgctcgcatg atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc 5220
5 tatgagcagg agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg 5280
gaagcaaaaag cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgctga agcgtctgga 5340
gagctgatac acggcgccg tgctcctctgg actgctccag ggctgcccgc ccgtgatgag 5400
10 acggccttttc gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta 5460
aaagacacca agggatcatc agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgctca ggccggtcga 5520
15 ggaggccgtg agcctgatct gccgccggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt 5580
gtgcgcggct acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag 5640
agccagccga ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtta aaaggccgca 5700
20 gaacgctgga aagacccaaa cagtgagtac gcccgagcac agcgagaaaa actagctaag 5760
tccagtcaac gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt 5820
atgactgttg agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt 5880
25 agcgtgtcac gtcagaccgt gaatagagca cttaaggctc gcgggcattg aacttccacg 5940
aggacgccga aagcttccca gtaaattgtc catctcgtag gcagaaaacg gttccccctg 6000
30 agggctctctc tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg 6060
gggctcacac cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaage gcacaaggac 6120
tgctcccaaa gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgccccgcgg 6180
35 aaatttctc caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaa cttctttcac cctaaattcg 6240
agagattgga ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg 6300
40 acgttggcgt cgggtgccgt gggtgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgctcg 6360
atttaaattc cg 6372

45 <210> 32
<211> 29
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>
<223> SEQ_ID_32

<400> 32
ggatctagag ttctgtgaaa aacaccgtg 29

55 <210> 33
<211> 29
<212> DNA
60 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_33

65 <400> 33
gcgactagtg cccacaaat aaaaaacac 29

<210> 34
 <211> 5156
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 5
 <220>
 <223> SEQ_ID_34
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (121)..(190)
 <223> GroEL Terminator
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (534)..(1325)
 <223> KanR
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1592)..(2452)
 <223> Ori-EC(pMB) complement
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2598)..(3272)
 <223> Orf1
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3606)..(4727)
 <223> Rep Protein
 35
 <400> 34
 tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag cacgcgtcat atgactagtt 60
 cggacctagg gatatcgtag acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggaccc 120
 ctagagttct gtgaaaaaca ccgtggggca gtttctgctt cgcgggtgtt tttatttgtg 180
 40
 gggcactaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 240
 aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 300
 45
 caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 360
 agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 420
 ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 480
 50
 gatggcgtag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcattgattg 540
 aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 600
 55
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 660
 ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg 720
 aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 780
 60
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 840
 tgtcatctca ccttgctcct gccagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 900
 65
 tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc 960
 gagcacgtac tcggatggaa gccgggtctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 1020

aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 1080
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 1140
5 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 1200
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 1260
10 ttacgggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 1320
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 1380
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 1440
15 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg ctggagtctt tcgcccacgc 1500
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 1560
gcacagggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 1620
20 ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1680
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1740
25 cggtgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1800
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 1860
gctccctcgt gcgctctct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 1920
30 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1980
aggctcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg 2040
35 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 2100
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct 2160
tgaagtggcg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 2220
40 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 2280
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 2340
45 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 2400
aagggatctt ggatcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 2460
gccgcggccg cgcaaagtcc cgcttcgtga aaattttcgt gccgcgtgat tttccgcaa 2520
50 aaactttaac gaacgttcgt tataatggcg tcatgacctt cagcaggaag tactaaaatt 2580
ggcccgaatc atcagctatg gatctctctg atgtcgcgct ggagtccgac gcgctcgatg 2640
55 ctgccgtcga tttaaaaacg gtgacggat tttccgagc tctcgatacg acggacgcgc 2700
cagcatcacg agactgggcc agtgccgcga gcgacctaga aactctcgtg gcggatcttg 2760
aggagctggc tgacgagctg cgtgctcggc cagcgccagg aggacgcaca gtagtggagg 2820
60 atgcaatcag ttgcgcctac tgcgggtggc tgattcctcc ccggcctgac ccgcgaggac 2880
ggcgcgcaaa atattgctca gatgcgtgtc gtgccgcagc cagccgcgag cgcgccaaca 2940
65 aacgccacgc cgaggagctg gaggcggcta ggctcgaaat ggcgctggaa gtgcgtcccc 3000
cgagcgaaat tttggccatg gtcgtcacag agctggaagc ggcagcgaga attatcgca 3060

tcgtggcggg gcccgcaggc atgacaaaca tcgtaaatgc cgcgtttcgt gtgccgtggc 3120
cgcccaggac gtgtcagcgc cgccaccacc tgcaccgaat cggcagcagc gtcgcgcgtc 3180
5 gaaaaagcgc acaggcggca agaagcgata agctgcacga atacctgaaa aatggtgaac 3240
gccccgtgag cggtaactca cagggcgctcg gctaaccccc agtccaaacc tgggagaaaag 3300
10 cgctcaaaaa tgactctagc ggattcacga gacattgaca caccggcctg gaaattttcc 3360
gctgatctgt tcgacacca tcccagagctc gcgctgcgat cacgtggctg gacgagcgaa 3420
gaccgcccgc aattcctcgc tcacctgggc agagaaaatt tccagggcag caagacccgc 3480
15 gacttcgcca gcgcttgat caaagaccgc gacacggaga aacacagccg aagttatacc 3540
gagttggttc aaaatcgctt gcccggtgcc agtatgttgc tctgacgcac gcgcagcacg 3600
cagccgtgct tgtcctggac attgatgtgc cgagccacca ggccggcggg aaaatcgagc 3660
20 acgtaaacc cagaggtctac gcgattttgg agcgtgggc acgcctggaa aaagcgccag 3720
cttgatcgg cgtgaatcca ctgagcggga aatgccagct catctggctc attgatccgg 3780
25 tgtatgccgc agcaggcatg agcagcccga atatgcgcct gctggctgca acgaccgagg 3840
aaatgaccgc cgttttcggc gctgaccagg ctttttcaca taggctgagc cgtggccact 3900
gcactctccg acgatcccag ccgtaccgct ggcatgccca gcacaatcgc gtggatcgcc 3960
30 tagctgatct tatggagggt gctcgcata tctcaggcac agaaaaacct aaaaaacgct 4020
atgagcagga gttttctagc ggacgggcac gtatcgaagc ggcaagaaaa gccactgcgg 4080
35 aagcaaaagc acttgccacg cttgaagcaa gcctgccgag cgcgctgaa gcgtctggag 4140
agctgatcga cggcgtccgt gtcctctgga ctgctccagg gcgtgccgcc cgtgatgaga 4200
cggcttttcg ccacgctttg actgtgggat accagttaaa agcggctggg gagcgcctaa 4260
40 aagacaccaa gggtcacga gcctacgagc gtgcctacac cgtcgtcag gcggtcggag 4320
gaggccgtga gcctgatctg ccgccggact gtgaccgcca gacggattgg ccgcgacgtg 4380
45 tgcgcggcta cgtcgctaaa ggccagccag tcgtccctgc tcgtcagaca gagacgcaga 4440
gccagccgag gcgaaaagct ctggccacta tgggaagacg tggcggtaaa aaggccgcag 4500
aacgctggaa agacccaaac agtgagtacg cccgagcaca gcgagaaaaa ctagctaagt 4560
50 ccagtcaacg acaagctagg aaagctaaag gaaatcgctt gaccattgca ggttggttta 4620
tgactgttga gggagagact ggctcgtggc cgacaatcaa tgaagctatg tctgaattta 4680
55 gcgtgtcacg tcagaccgtg aatagagcac ttaaggctct cgggcattga acttccacga 4740
ggacgccgaa agcttcccag taaatgtgcc atctcgtagg cagaaaacgg tcccccgta 4800
gggtctctct cttggcctcc tttctaggct gggctgattg ctcttgaagc tctctagggg 4860
60 ggctcacacc ataggcagat aacgttcccc accggctcgc ctctgaagcg cacaaggact 4920
gctcccaaag atcttcaaag ccactgccgc gactgccttc gcgaagcctt gccccgcgga 4980
65 aatttcctcc accgagttcg tgcacacccc tatgccaaag ttctttcacc ctaaattcga 5040
gagattggat tcttaccgtg gaaattcttc gcaaaaatcg tcccctgatc gcccttgcca 5100

cgttggcgtc ggtgccgctg gttgcgcttg gcttgaccga cttgatcagc ggccgc 5156

5 <210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>
<223> SEQ_ID_35

<400> 35
gagacatatg cccaccctcg cgccttcagg 30

15 <210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>
<223> SEQ_ID_36

<400> 36
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

30 <210> 37
<211> 6287
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

35 <220>
<223> SEQ_ID_37_PCLIK5MCS_META_OHNE_STARTCODON

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(1184)
<223> MetA without startcodon

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1252)..(1321)
<223> GroEL Terminator

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (1665)..(2456)
<223> KanR

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (2723)..(3583)
<223> Ori-EC(pMB) complement

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (3729)..(4403)
<223> Orf1

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (4737)..(5858)
<223> REP Protein

65 <400> 37
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag cacgcgtcat atgcccaccc 60

tcgcgccttc aggtcaactt gaaatccaag cgatcgggtga tgtctccacc gaagccggag 120
caatcattac aaacgctgaa atcgcctatc accgctgggg tgaataccgc gtagataaag 180
5 aaggacgcag caatgtcggt ctcacgaac acgccctcac tggagattcc aacgcagccg 240
attggtgggc tgacttgctc ggtcccggca aagccatcaa cactgatatt tactgctga 300
10 tctgtaccaa cgtcatcggt ggttgcaacg gttccaccgg acctggctcc atgcatccag 360
atggaaattt ctggggtaat cgcttccccg ccacgtccat tcgtgatcag gtaaaccgccg 420
aaaaacaatt cctcgacgca ctcggcatca ccacggtcgc cgcagtactt ggtgggtcca 480
15 tgggtggtgc ccgcacccta gagtgggccc caatgtaccc agaaactgtt ggccgagctg 540
ctgttcttgc agtttctgca cgcgccagcg cctggcaa at cggcattcaa tccgccc aaa 600
ttaaggcgat tgaaaacgac caccactggc acgaaggcaa ctactacgaa tccggctgca 660
20 acccagccac cggactcggc gccgcccgc gcacgccc cctcacctac cgtggcgaac 720
tagaaatcga cgaacgcttc ggcaccaaag cccaaaagaa cgaaaacca ctcggctcct 780
25 accgcaagcc cgaccagcg ctcgccgtgg aatcctactt ggactaccaa gcagacaagc 840
tagtacagcg ttctgacgcc ggctcctacg tcttgctcac cgacgccctc aaccgccacg 900
acattggtcg cgaccgcgga ggcctcaaca aggactcga atccatcaaa gttccagtcc 960
30 ttgtcgcagg cgtagatacc gatattttgt acccctacca ccagcaagaa cacctctcca 1020
gaaacctggg aaatctactg gcaatggcaa aaatcgtatc ccctgtcggc cacgatgctt 1080
35 tcctcaccga aagccgccc aaatgacgca tcgtgaggaa cttcttcagc ctcactctcc 1140
cagacgaaga caacccttcg acctacatcg agttctacat ctaaactagt tcggacctag 1200
ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc tctagagttc 1260
40 tgtgaaaaac accgtggggc agtttctgct tcgcggtgtt ttttatttgt ggggcactag 1320
acccgggatt taaatcgcta gcgggctgct aaaggaagcg gaacacgtag aaagccagtc 1380
45 cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg ggctatctgg acaagggaaa 1440
acgcaagcgc aaagagaaa caggtagctt gcagtgggct tacatggcga tagctagact 1500
gggcgggttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctggtaagg 1560
50 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc gccaaaggatc tgatggcgca 1620
ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg 1680
55 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac 1740
aacagacaat cggctgctct gatgccgcgc tggtccggct gtcagcgagc gggcgcccgc 1800
ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc 1860
60 ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg 1920
aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc 1980
65 acctgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc 2040
ttgatccggc tacctgccc aatcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta 2100

ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg 2160
cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcagcc cgacggcgag gatctcgtcg 2220
5 tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat 2280
tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 2340
10 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg ctctctcgtg ctttacggta 2400
tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag 2460
cgggactctg gggttcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat cacgagattt 2520
15 cgattccacc gccgccttct atgaaagggt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg 2580
ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagtgc ttcgcccacg ctacggcgcg 2640
gccggccggc ccggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc 2700
20 gctcttccgc ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg 2760
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 2820
25 agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 2880
cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga 2940
gggtggcga aa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 3000
30 tgcgctctcc tgttcgcacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 3060
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 3120
35 gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 3180
gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 3240
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagtgc ttgaagtggg 3300
40 ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 3360
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 3420
45 gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 3480
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt 3540
tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaaggcc ggccgcggcc 3600
50 gcgcaaagtc ccgcttcgtg aaaattttcg tgccgcgtga tttccgcca aaaacttta 3660
cgaacgttcg ttataatggg gtcacgacct tcacgacgaa gtactaaaat tggcccgaat 3720
55 catcagctat ggatctctct gatgtcgcgc tggagtccga cgcgctcgat gctgccgtcg 3780
atttaaaaac ggtgatcgga tttttccgag ctctcgatac gacggacgcg ccagcatcac 3840
gagactgggc cagtgcgcgc agcgacctag aaactctcgt ggcggatctt gaggagctgg 3900
60 ctgacgagct gcgtgctcgg ccagcgccag gaggacgcac agtagtgag gatgcaatca 3960
gttgcgccta ctgcggtggc ctgattcctc cccggcctga cccgcgagga cggcgcgcaa 4020
65 aatattgctc agatgcgtgt cgtgccgcag ccagccgcga gcgcgccaac aaacgccacg 4080
ccgaggagct ggaggcggct aggtcgcaaa tggcgctgga agtgcgtccc ccgagcgaaa 4140

ttttggccat ggtcgtcaca gagctggaag cggcagcgag aattatcgcg atcgtggcgg 4200
tgcccgcagg catgacaaac atcgtaaata cgcggtttcg tgtgccgtgg ccgcccagga 4260
5 cgtgtcagcg ccgccaccac ctgcaccgaa tcggcagcag cgtcgcgcgt cgaaaaagcg 4320
cacaggcggc aagaagcgat aagctgcacg aatacctgaa aaatgttgaa cgccccgtga 4380
10 gcggtaactc acagggcgct ggctaacccc cagtccaaac ctgggagaaa gcgctcaaaa 4440
atgactctag cggattcacg agacattgac acaccggcct ggaaattttc cgctgatctg 4500
ttcgacaccc atcccagct cgcgctgcga tcacgtggct ggacgagcga agaccgccgc 4560
15 gaattcctcg ctcacctggg cagagaaaat ttccagggca gcaagaccgc cgacttcgcc 4620
agcgcttgga tcaaagaccc ggacacggag aaacacagcc gaagttatac cgagttggtt 4680
20 caaaatcgct tgcccgggtgc cagtatgttg ctctgacgca cgcgcagcac gcagccgtgc 4740
ttgtcctgga cattgatgtg ccgagccacc aggccggcgg gaaaatcgag cacgtaaacc 4800
ccgaggtcta cgcgattttg gagcgtggg cacgcctgga aaaagcgcca gcttggatcg 4860
25 gcgtgaatcc actgagcggg aaatgccagc tcactgtggt cattgatccg gtgtatgccg 4920
cagcaggcat gagcagcccg aatatgcgcc tgctgggtgc aacgaccgag gaaatgaccc 4980
30 gcgttttcgg cgctgaccag gctttttcac ataggctgag ccgtggccac tgcactctcc 5040
gacgatccca gccgtaccgc tggcatgccc agcacaatcg cgtggatcgc ctagctgatc 5100
ttatggaggt tgctcgcatt atctcaggca cagaaaaacc taaaaaacgc tatgagcagg 5160
35 agttttctag cggacgggca cgtatcgaag cggcaagaaa agccactgcg gaagcaaaag 5220
cacttgccac gcttgaagca agcctgccga gcgccgctga agcgtctgga gagctgatcg 5280
40 acggcgctccg tgtcctctgg actgctccag ggcggtgccg ccgtgatgag acggcttttc 5340
gccacgcttt gactgtggga taccagttaa aagcggctgg tgagcgccta aaagacacca 5400
agggtcatcg agcctacgag cgtgcctaca ccgtcgtcga ggcggtcgga ggaggccgtg 5460
45 agcctgatct gccgcgggac tgtgaccgcc agacggattg gccgcgacgt gtgcgcggct 5520
acgtcgctaa aggccagcca gtcgtccctg ctcgtcagac agagacgcag agccagccga 5580
50 ggcgaaaagc tctggccact atgggaagac gtggcggtaa aaaggccgca gaacgctgga 5640
aagacccaaa cagtgagtac gcccagacac agcgagaaaa actagctaag tccagtcaac 5700
gacaagctag gaaagctaaa ggaaatcgct tgaccattgc aggttggttt atgactgttg 5760
55 agggagagac tggctcgtgg ccgacaatca atgaagctat gtctgaattt agcgtgtcac 5820
gtcagaccgt gaatagagca ctttaaggct gcgggcattg aacttccacg aggacgccga 5880
60 aagcttccca gtaaagtgtc catctcgtag gcagaaaacg gttccccgt agggctcttc 5940
tcttggcctc ctttctaggt cgggctgatt gctcttgaag ctctctaggg gggctcacac 6000
cataggcaga taacgttccc caccggctcg cctcgtaagc gcacaaggac tgctcccaaa 6060
65 gatcttcaaa gccactgccg cgactgcctt cgcgaagcct tgccccgcgg aaatttcctc 6120
caccgagttc gtgcacaccc ctatgccaa cttctttcac cctaaattcg agagattgga 6180

ttcttaccgt ggaaattctt cgcaaaaatc gtcccctgat cgcccttgcg acgttggcgt 6240
cggtgccgct ggttgcgctt ggcttgaccg acttgatcag cggccgc 6287

5
<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

10
<220>
<223> SEQ_ID_38_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1701

15
<400> 38
gagactcgag cggcttaaag tttggctgcc 30

20
<210> 39
<211> 32
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

25
<220>
<223> SEQ_ID_39_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1828

<400> 39
ctctcatatg caatccctcc atgagaaaaa tt 32

30
<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

35
<220>
<223> SEQ_ID_40_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1831

40
<400> 40
ctctcatatg cgcggccgca atccctccat gagaaaaatt 40

45
<210> 41
<211> 39
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

50
<220>
<223> SEQ_ID_41_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1832

<400> 41
ctctcatatg caatctctcc atgagaaaaa ttttgtgtg 39

55
<210> 42
<211> 39
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

60
<220>
<223> SEQ_ID_42_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1833

<400> 42
ctctcatatg caatctctcc atgagaaaaa ttttgtgtg 39

65
<210> 43
<211> 39
<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_43_OLIGONUKLEOTIDPRIMER_1834

5 <400> 43
ctctcatatg caatcccttc atgagaaaaa ttttgtgtg 39

10 <210> 44
<211> 2961
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

15 <220>
<223> SEQ_ID_44_PBS_KS+

<400> 44

20 ctaaattgta agcgtaata tttgttaaa attcgcgta aatttttgtt aaatcagctc 60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
gataggggtg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc 180

25 caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag 300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa 360

30 agcgaaagga gcggcgctta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac 420
cacaccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg 480

35 caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg 540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg 600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tggagctcca 660

40 ccgcgggtggc ggccgctcta gaactagtgg atcccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa 720
gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg gcccggtacc cagcttttgt tccctttagt 780

45 gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggcatagct gtttctgtg tgaaattgtt 840
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg 900
cctaataagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg 960

50 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc 1020
gtattgggcg ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 1080

55 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 1140
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 1200
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 1260

60 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 1320
gtccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacctg tccgccttcc 1380

65 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1440
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1500

ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1560
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 1620
5 tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtatc tgcgctctgc 1680
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1740
10 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1800
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 1860
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa 1920
15 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttgggtctgac agttaccaat 1980
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct 2040
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgcctg 2100
20 caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2160
ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2220
25 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtg 2280
ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2340
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2400
30 ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatgggta 2460
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2520
35 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2580
cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 2640
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 2700
40 tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2760
ggtagcaaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 2820
45 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gggtattgtc 2880
tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 2940
catttccccg aaaagtgcc c 2961
50

<210> 45
<211> 6431
<212> DNA
55 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_45_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1828_META

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1828

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2104)..(2173)
 5 <223> GroEL Terminator

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2517)..(3308)
 10 <223> KanR

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3575)..(4435)
 15 <223> Ori-EC(pMB) complement

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4581)..(5255)
 20 <223> Orf1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5589)..(279)
 25 <223> REP Protein

<400> 45
 aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggta aaaaggccgc agaacgctgg 60
 30 aaagacccaa acagtgaagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggt tatgactgtt 180
 gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
 35 cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggtc tgcgggcatt gaacttccac gaggacgccg 300
 aaagcttccc agtaaagtgt ccatctcgta ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctt 360
 40 ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
 agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttctt 540
 45 ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600
 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660
 50 tcggtgccgc tggttgcgct tggttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaata 720
 tcgagcggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtt 780
 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgcac 840
 55 gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gagggattgc 900
 atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960
 60 ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgctta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020
 gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080
 ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcgggtcccg caaagccatc aacactgata 1140
 65 ttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200
 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260

aggtaaacgc cgaaaaacaa ttcctcgacg cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320
5 ttggtgggtc catgggtggg gcccgacccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgectggcaa atcggcattc 1440
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
10 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgcgccccg acgcatcgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620
15 cactcggtec ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgcccgt ggaatcctac ttggactacc 1680
aagcagacaa gctagtacag cgtttcgacg ccggctccta cgtcttgctc accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggg cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
20 aagttccagt ccttgtcgca ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920
gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980
25 gcctcatctc ccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100
30 cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg ttttttattt 2160
gtggggcact agaccggga tttaaatcgc tagcgggctg ctaaagggaag cggaacacgt 2220
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
35 ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340
gatagctaga ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
40 cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460
tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga 2520
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580
45 atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700
50 acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg 2760
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820
tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
55 ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg 2940
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
60 atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 3060
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc 3120
gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
65 cgttggtac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgc 3240
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg 3300

agttcttctg agcgggactc tgggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
5 atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420
ccgggacgcc ggctggatga tctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3480
cgctagcggc gcgccggccg gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540
10 accgcatcag gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatcgt gttatccaca gaatcagggg 3660
15 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
20 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg 3960
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020
25 gcgccttacc cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt 4140
30 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc 4200
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260
ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
35 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380
gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg 4440
40 ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgccttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc 4500
caaaaacttt aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620
45 atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680
cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740
50 ttgaggagct ggctgacgag ctgctgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag 4860
gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca 4920
55 acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980
ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040
60 cgatcgtggc ggtgcccga ggcatacaca acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160
gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaataacctg aaaaatgttg 5220
65 aacgccccgt gagcggtaac tcacaggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga 5280
aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340

tccgctgac tgttcgacac ccatcccag ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
5 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat 5520
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
10 acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
agcacgtaaa ccccgagggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
cagcttggat cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac 5760
15 cgggtgatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcgttttc acataggctg agccgtggcc 5880
20 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060
25 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgcc gcccgctgatg 6180
30 agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240
taaaagacac caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
35 gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
agagccagcc g 6431

40

<210> 46
<211> 6439
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

45

<220>
<223> SEQ_ID_46_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1831_META

50

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(183)
<223> P1701/1831

55

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)..(1329)
<223> MetA without startcodon

60

<220>
<221> misc_feature
<222> (1397)..(1466)
<223> GroEL Terminator

65

<220>
<221> misc_feature
<222> (1810)..(2601)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2868)..(3728)
<223> Ori-EC(pMB) complement
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (3874)..(4548)
<223> Orf1
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (4882)..(6003)
<223> REP Protein
15
<400> 46
aaatctcgag cggcttaaag tttggctgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga 60
gtgctggcac tctcgggggt agagtgccaa ataggttgtt tgacacacag ttgttcaccc 120
20 gcgacgacgg ctgtgctgga aaccacaaac cggcacacac aaaatttttc tcatggaggg 180
attgcgggccg cgcataatgcc caccctcgcg ccttcaggtc aacttgaaat ccaagcgatc 240
25 ggtgatgtct ccaccgaagc cggagcaatc attacaaacg ctgaaatcgc ctatcaccgc 300
tggggtgaat accgcgtaga taaagaagga cgcagcaatg tcgttctcat cgaacacgcc 360
ctcactggag attccaacgc agccgattgg tgggctgact tgctcggtcc cggcaaagcc 420
30 atcaacactg atatttactg cgtgatctgt accaacgtca tcggtgggtg caacggttcc 480
accggacctg gctccatgca tccagatgga aatttctggg gtaatcgctt ccccgccacg 540
35 tccattcgty atcaggtaaa cggcgaaaaa caattcctcg acgcactcgg catcaccacg 600
gtcgccgcag tacttggtgg ttccatgggt ggtgcccgcg ccctagagtg ggccgcaatg 660
taccagaaa ctggtggcgc agctgctgtt cttgcagttt ctgcacgcgc cagcgccctgg 720
40 caaatcggca ttcaatccgc ccaaattaag gcgattgaaa acgaccacca ctggcacgaa 780
ggcaactact acgaatccgg ctgcaaccca gccaccggac tcggcgccgc ccgacgcata 840
45 gccacactca cctaccgtgg cgaactagaa atcgacgaac gcttcggcac caaagcccaa 900
aagaacgaaa acccactcgg tccctaccgc aagcccgacc agcgcttcgc cgtggaatcc 960
tacttggtact accaagcaga caagctagta cagcgtttcg acgcccggctc ctacgtcttg 1020
50 ctcaccgacg ccctcaaccg ccacgacatt ggtcgcgacc gcggaggcct caacaaggca 1080
ctcgaatcca tcaaagttcc agtccttgct gcaggcgtag ataccgatat tttgtacccc 1140
55 taccaccagc aagaacacct ctccagaaac ctgggaaatc tactggcaat ggcaaaaatc 1200
gtatcccctg tcggccacga tgctttcttc accgaaagcc gccaaatgga tcgcatcgtg 1260
aggaacttct tcagcctcat ctccccagac gaagacaacc cttcgacctc catcgagtcc 1320
60 tacatctaaa ctagtccgga cctagggata tcgtcgacat cgatgctctt ctgctgtaat 1380
taacaattgg gatcctctag agttctgtga aaaacaccgt ggggcagttt ctgcttcgcg 1440
65 gtgtttttta tttgtggggc actagaccgc ggatttaaat cgctagcggg ctgctaaagg 1500
aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccgat gaatgtcagc 1560

tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcaagt 1620
gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg 1680
5 ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc 1740
ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga 1800
10 tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag 1860
aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc 1920
cggtgtcag cgagggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg 1980
15 aatgaactgc aggacgaggc agcgcggtta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc 2040
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 2100
ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct 2160
20 gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg 2220
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgctga tcaggatgat 2280
25 ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcg 2340
atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg 2400
gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 2460
30 tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 2520
gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat 2580
35 cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgaaatgacc gaccaagcga 2640
cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct 2700
tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg 2760
40 agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgccgg ccggcccggg gtgaaatacc gcacagatgc 2820
gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttctt cgctcactga ctcgctgcgc 2880
45 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc 2940
acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg 3000
aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat 3060
50 caaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag 3120
gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga 3180
55 tacctgtccg cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg 3240
tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt 3300
cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacct ggtaagacac 3360
60 gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc 3420
ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt 3480
65 ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc 3540
ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc 3600

agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg 3660
aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag 3720
5 atccttttaa aggccggccg cggccgcgca aagtcccgtc tcgtgaaaat tttcgtgccg 3780
cgtgattttc cgccaaaaac tttaacgaac gtctgttata atgggtgtcat gaccttcacg 3840
10 acgaagtact aaaattggcc cgaatcatca gctatggatc tctctgatgt cgcgctggag 3900
tccgacgcgc tcgatgctgc cgtcgattta aaaacgggtga tcggattttt ccgagctctc 3960
gatacgacgg acgcgccagc atcacgagac tgggccagtg ccgcgagcga cctagaaact 4020
15 ctctgtggcg atcttgagga gctggctgac gagctgcgtg ctccggccagc gccaggagga 4080
cgcacagtag tggaggatgc aatcagttgc gcctactgcy gtggcctgat tctctcccgg 4140
cctgaccgcg gaggacggcg cgaaaatat tgctcagatg cgtgtcgtgc cgcagccagc 4200
20 cgcgagcgcg ccaacaaacg ccacgccgag gagctggagg cggctagggtc gcaaattggcg 4260
ctggaagtgc gtcccccgag cgaaattttg gccatggctg tcacagagct ggaagcggca 4320
25 gcgagaatta tcgcgatcgt ggcggtgccc gcaggcatga caaacatcgt aaatgccgcg 4380
tttcgtgtgc cgtggccgcc caggacgtgt cagcgccgcc accacctgca ccgaatcggc 4440
agcagcgtcg cgcgtcgaaa aagcgcacag gcggcaagaa gcgataagct gcacgaatac 4500
30 ctgaaaaatg ttgaacgccc cgtgagcggc aactcacagg gcgtcggcta acccccagtc 4560
caaacctggg agaaagcgtc caaaaatgac tctagcggat tcacgagaca ttgacacacc 4620
35 ggcctggaaa ttttccgctg atctgttcga caccatccc gagctcgcgc tgcgatcacg 4680
tggctggacg agcgaagacc gccgcgaatt cctcgctcac ctgggcagag aaaatttcca 4740
gggcagcaag acccgcgact tcgccagcgc ttggatcaaa gaccgggaca cggagaaaca 4800
40 cagccgaagt tataccgagt tggttcaaaa tcgcttgccc ggtgccagta tgttgctctg 4860
acgcacgcgc agcacgcagc cgtgcttgtc ctggacattg atgtgccgag ccaccaggcc 4920
45 ggcgggaaaa tcgagcacgt aaaccccagag gtctacgcga ttttgagcgc ctgggcacgc 4980
ctggaaaaag cgccagcttg gatcggcgtg aatccactga gcgggaaatg ccagctcatc 5040
tggctcattg atccggtgta tgccgcagca ggcatgagca gcccgaatat gcgcctgctg 5100
50 gctgcaacga ccgaggaaat gaccgcggtt ttcggcgctg accaggcttt ttcacatagg 5160
ctgagccgtg gccactgcac tctccgacga tcccagccgt accgctggca tgcccagcac 5220
55 aatcgcgtgg atcgcctagc tgatcttatg gaggttgctc gcatgatctc aggcacagaa 5280
aaacctaaaa aacgctatga gcaggagttt tctagcggac gggcacgtat cgaagcggca 5340
agaaaagcca ctgcggaagc aaaagcactt gccacgcttg aagcaagcct gccgagcgcc 5400
60 gctgaagcgt ctggagagct gatcgacggc gtccgtgtcc tctggactgc tccagggcgt 5460
gccgcccgtg atgagacggc ttttcgccac gctttgactg tgggatacca gttaaaagcg 5520
65 gctggtgagc gcctaaaaga caccaagggt catcgagcct acgagcgtgc ctacaccgtc 5580
gctcaggcgg tcggaggagg ccgtgagcct gatctgccgc cggactgtga ccgccagacg 5640

gattggccgc gacgtgtgcg cggctacgtc gctaaaggcc agccagtcgt ccctgctcgt 5700
cagacagaga cgcagagcca gccgaggcga aaagctctgg ccactatggg aagacgtggc 5760
5 ggtaaaaagg ccgcagaacg ctggaaagac ccaaacagtg agtacgcccg agcacagcga 5820
gaaaaactag ctaagtccag tcaacgacaa gctaggaaag ctaaaggaaa tcgcttgacc 5880
10 attgcagggtt ggtttatgac tgttgaggga gagactggct cgtggccgac aatcaatgaa 5940
gctatgtctg aatttagcgt gtcacgtcag accgtgaata gagcacttaa ggtctgcggg 6000
cattgaactt ccacgaggac gccgaaagct tcccagtaaa tgtgccatct cgtaggcaga 6060
15 aaacggttcc cccgtagggg ctctctcttg gcctcctttc taggtcgggc tgattgctct 6120
tgaagctctc taggggggct cacaccatag gcagataacg ttccccaccg gctcgcctcg 6180
taagcgcaca aggactgctc ccaaagatct tcaaagccac tgccgcgact gccttcgcga 6240
20 agccttgccc cgcggaaatt tcctccaccg agttcgtgca caccctatg ccaagcttct 6300
ttcaccctaa attcgagaga ttggattctt accgtggaaa ttcttcgcaa aaatcgctcc 6360
25 ctgatcgccc ttgcgacgtt ggcgtcgggtg ccgctgggtg cgcttggtt gaccgacttg 6420
atcagcggcc gctcgattt 6439

30 <210> 47
<211> 6431
<212> DNA :
<213> Corynebacterium glutamicum
35 <220>
<223> SEQ_ID_47_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1832_META
40 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1832
45 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon
50 <220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
<223> GroEL Terminator
55 <220>
<221> misc_feature
<222> (2517)..(3308)
<223> KanR
60 <220>
<221> misc_feature
<222> (3575)..(4435)
<223> Ori-EC(pMB) complement
65 <220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
<223> Orf1
<220>

<221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
<223> REP Protein

5 <400> 47
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtg aaaaggccgc agaacgctgg 60
aaagacccaa acagtgagta cgcccagagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
10 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggt tatgactgtt 180
gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggct tgcgggcatt gaacttcac gaggacgccg 300
15 aaagcttccc agtaaattgt ccatctcgtg ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctt 360
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
20 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttcct 540
ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600
25 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccttga tcgcccttgc gacgttggcg 660
tcggtgccgc tggttgcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaata 720
30 tcgagcggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgt 780
ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg gagagattgc 900
35 atatgcccac cctcgcgcct tcagggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgccta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020
40 gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080
ccaacgcagc cgattggtgg gctgacttgc tcggctcccg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200
45 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgcagc cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320
50 ttggtggttc catgggtggg gcccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcctggcaa atcggcattc 1440
aatccgccc aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
55 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgccgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agccc aaaag aacgaaaacc 1620
60 cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgccgt ggaatcctac ttggactacc 1680
aagcagacaa gctagtacag cgtttcgcag ccggctccta cgtcttgctc accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggg cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
65 aagttccagt ccttgctcga ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920

gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980
5 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgcctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100
cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg ttttttatatt 2160
10 gtggggcact agaccggga tttaaactgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt 2220
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
15 ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340
gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460
20 tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata 2520
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640
25 aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 2760
30 acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgcatttggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820
tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
35 ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg 2940
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 3060
40 aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
45 cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg 3300
agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
50 atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3480
55 cgctagcggc gcgccggccg gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540
accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatcgc gttatccaca gaatcagggg 3660
60 ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720
ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
65 gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg 3960

5 t g t a g g t c g t t c g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a c c c c c c g t t c a g c c c g a c c g c t 4020
t g c g c c t t a t c c g g t a a c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a g a c a c g a c t t a t c g c c a c 4080
t g g c a g c a g c c a c t g g t a a c a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g c g g t g c t a c a g a g t 4140
t c t t g a a g t g g t g g c c t a a c t a c g g c t a c a c t a g a a g g a c a g t a t t t g g t a t c t g c g c t c 4200
10 t g c t g a a g c c a g t t a c c t t c g g a a a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a 4260
c c g c t g g t a g c g g t g g t t t t t t t g t t t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a a g g a t 4320
c t c a a g a a g a t c c t t t g a t c t t t t c t a c g g g g t c t g a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c 4380
15 g t t a a g g g a t t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a a a g g a t c t t c a c c t a g a t c c t t t t a a a g g 4440
c c g g c c g c g g c c g c g c a a a g t c c c g c t t c g t g a a a a t t t t c g t g c c g c g t g a t t t t c c g c 4500
20 c a a a a a c t t t a a c g a a c g t t c g t t a t a a t g g t g t c a t g a c c t t c a c g a c g a a g t a c t a a a 4560
a t t g g c c c g a a t c a t c a g c t a t g g a t c t c t c t g a t g t c g c g c t g g a g t c c g a c g c g c t c g 4620
a t g c t g c c g t c g a t t t a a a a a c g g t g a t c g g a t t t t t c c g a g c t c t c g a t a c g a c g g a c g 4680
25 c g c c a g c a t c a c g a g a c t g g g c c a g t g c c g c g a g c g a c c t a g a a a c t c t c g t g g c g g a t c 4740
t t g a g g a g c t g g c t g a c g a g c t g c g t g c t c g g c c a g c g c c a g g a g g a c g c a c a g t a g t g g 4800
30 a g g a t g c a a t c a g t t g c g c c t a c t g c g g t g g c c t g a t t c c t c c c c g g c c t g a c c c g c g a g 4860
g a c g g c g c g c a a a a t a t t g c t c a g a t g c g t g t c g t g c c g c a g c c a g c c g c g a g c g c g c c a 4920
a c a a a c g c c a c g c c g a g g a g c t g g a g g c g g c t a g g t c g c a a a t g g c g c t g g a a g t g c g t c 4980
35 c c c c g a g c g a a a t t t t g g c c a t g g t c g t c a c a g a g c t g g a a g c g g c a g c g a g a a t t a t c g 5040
c g a t c g t g g c g g t g c c c g c a g g c a t g a c a a a c a t c g t a a a t g c c g c g t t t c g t g t g c c g t 5100
40 g g c c g c c c a g g a c g t g t c a g c g c c g c c a c c a c c t g c a c c g a a t c g g c a g c a g c g t c g c g c 5160
g t c g a a a a a g c g c a c a g g c g g c a a g a a g c g a t a a g c t g c a c g a a t a c c t g a a a a a t g t t g 5220
a a c g c c c c g t g a g c g g t a a c t c a c a g g g c g t c g g c t a a c c c c c a g t c c a a a c c t g g g a g a 5280
45 a a g c g c t c a a a a a t g a c t c t a g c g g a t t c a c g a g a c a t t g a c a c a c c g g c c t g g a a a t t t 5340
t c c g c t g a t c t g t t c g a c a c c c a t c c c g a g c t c g c g c t g c g a t c a c g t g g c t g g a c g a g c 5400
50 g a a g a c c g c c g c g a a t t c c t c g c t c a c c t g g g c a g a g a a a a t t t c c a g g g c a g c a a g a c c 5460
c g c g a c t t c g c c a g c g c t t g g a t c a a a g a c c c g g a c a c g g a g a a a c a c a g c c g a a g t t a t 5520
a c c g a g t t g g t t c a a a a t c g c t t g c c c g g t g c c a g t a t g t t g c t c t g a c g c a c g c g c a g c 5580
55 a c g c a g c c g t g c t t g t c c t g g a c a t t g a t g t g c c g a g c c a c c a g g c c g g c g g g a a a a t c g 5640
a g c a c g t a a a c c c c g a g g t c t a c g c g a t t t t g g a g c g c t g g g c a c g c c t g g a a a a a g c g c 5700
60 c a g c t t g g a t c g g c g t g a a t c c a c t g a g c g g g a a a t g c c a g c t c a t c t g g c t c a t t g a t c 5760
c g g t g t a t g c c g c a g c a g g c a t g a g c a g c c c g a a t a t g c g c c t g c t g g c t g c a a c g a c c g 5820
a g g a a a t g a c c c g c g t t t t c g g c g c t g a c c a g g c t t t t t c a c a t a g g c t g a g c c g t g g c c 5880
65 a c t g c a c t c t c c g a c g a t c c c a g c c g t a c c g c t g g c a t g c c c a g c a c a a t c g c g t g g a t c 5940
g c c t a g c t g a t c t t a t g g a g g t t g c t c g c a t g a t c t c a g g c a c a g a a a a a c c t a a a a a a c 6000

gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060
5 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgct cgtgtectct ggactgctcc agggcgctgcc gcccgatg 6180
agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240
10 taaaagacac caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg 6300
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
15 gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
agagccagcc g 6431

<210> 48
20 <211> 6431
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
25 <223> SEQ_ID_48_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1833_META

<220>
30 <221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1833

<220>
35 <221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon

<220>
40 <221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
<223> GroEL Terminator

<220>
45 <221> misc_feature
<222> (2517)..(3308)
<223> KanR

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (3575)..(4435)
<223> Ori-EC(pMB) complement

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
<223> Orf1

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
<223> REP Protein

<400> 48
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtg aaaaggccgc agaacgctgg 60
65 aaagaccaa acagtgagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttggtt tatgactgtt 180

gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggctc tgcgggcatt gaacttccac gaggacgccg 300
5 aaagcttccc agtaaagtgt ccatctcgta ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctct 360
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
10 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgag gaaatttcct 540
ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600
15 attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660
tcggtgccgc tggttgcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaate 720
tcgagcggct taaagtttgg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgt 780
20 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat tttctcatg aggagattgc 900
25 atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960
ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgcta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020
gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080
30 ccaacgcagc cgattggtgg gctgacttgc tcgggtcccg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgctg gatctgtacc aacgtcatcg gtgggtgcaa cggttccacc ggacctggct 1200
35 ccatgcatcc agatggaaat ttctggggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260
aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgcagc cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320
40 ttggtggttc catgggtggg gccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380
ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcctggcaa atcggcattc 1440
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
45 aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgcgcgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560
accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620
cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgccgt ggaatcctac ttggactacc 1680
50 aagcagacaa gctagtacag cgtttcgcag ccggctccta cgtcttgctc accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggg cgcgaccgag gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
55 aagttccagt ccttgtcgca ggcgtagata ccgatatttt gtacccttac caccagcaag 1860
aacacctctc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920
gccacgatgc tttctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980
60 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100
65 cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcggtg ttttttattt 2160
gtggggcact agaccggga tttaaategc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt 2220

agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
ggacaagggg aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340
5 gatagctaga ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
cctctggtaa gggtgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460
tctgatggcg caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga 2520
10 ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580
atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640
15 aggggcgccc gggtcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg 2700
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg 2760
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820
20 tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg 2940
25 agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 3060
aggatctcgt cgtgacctat ggcatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc 3120
30 gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240
35 tgctttacgg tategccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg 3300
agttcttctg agcgggactc tgggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
atcacgagat ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420
40 ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 3480
cgctagcggc gcgccggccg gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540
45 accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600
tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaagg gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg 3720
50 ccgcgttget ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
55 gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900
ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg 3960
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020
60 gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 4140
65 tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatattgg atctgcgctc 4200
tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260

ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380
5 gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaaagg 4440
ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgccttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc 4500
caaaaacttt aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
10 attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620
atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680
15 cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740
ttgaggagct ggctgacgag ctgctgtctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag 4860
20 gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gacgcgcgca 4920
acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980
25 ccccgagcga aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040
cgatcgtggc ggtgcccgcg ggcattgaca acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160
30 gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg 5220
aacgccccgt gagcggtaac tcacaggcg tggtctaacc ccagtccta acctgggaga 5280
35 aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340
tccgctgate tgttcgacac ccatcccag ctgcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
40 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat 5520
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc 5580
45 acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
cagcttggtat cggcgtgaat ccactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgat 5760
50 cgggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggccttttc acataggctg agccgtggcc 5880
55 actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac 6000
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060
60 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgatg 6180
65 agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240
taaaagacac caagggcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgt caggcggctc 6300

gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
5 agagccagcc g 6431

<210> 49
<211> 6431
10 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_49_PCLIK5MCS_PGRO_1701_1834_META
15 <220>
<221> misc_feature
<222> (726)..(899)
<223> P1701/1834
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (906)..(2036)
<223> MetA without startcodon
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (2104)..(2173)
<223> GroEL Terminator
30 <220>
<221> misc_feature
<222> (2517)..(3308)
<223> KanR
35 <220>
<221> misc_feature
<222> (3575)..(4435)
<223> Ori-EC(pMB) complement
40 <220>
<221> misc_feature
<222> (4581)..(5255)
<223> Orf1
45 <220>
<221> misc_feature
<222> (5589)..(279)
<223> REP Protein
50 <400> 49
aggcgaaaag ctctggccac tatgggaaga cgtggcggtta aaaaggccgc agaacgctgg 60
aaagacccaa acagtgagta cgcccgagca cagcgagaaa aactagctaa gtccagtcaa 120
55 cgacaagcta ggaaagctaa aggaaatcgc ttgaccattg caggttgggtt tatgactgtt 180
gagggagaga ctggctcgtg gccgacaatc aatgaagcta tgtctgaatt tagcgtgtca 240
60 cgtcagaccg tgaatagagc acttaaggtc tgcgggcatt gaacttccac gaggacgccg 300
aaagcttccc agtaaattgtg ccatctcgta ggcagaaaac ggttcccccg tagggctctct 360
ctcttggcct cctttctagg tcgggctgat tgctcttgaa gctctctagg ggggctcaca 420
65 ccataggcag ataacgttcc ccaccggctc gcctcgtaag cgcacaagga ctgctcccaa 480
agatcttcaa agccactgcc gcgactgcct tcgcgaagcc ttgccccgcg gaaatttctt 540

ccaccgagtt cgtgcacacc cctatgccaa gcttctttca ccctaaattc gagagattgg 600
attcttaccg tggaaattct tcgcaaaaat cgtcccctga tcgcccttgc gacgttggcg 660
5 tcggtgccgc tggttgcgct tggcttgacc gacttgatca gcggccgctc gatttaaate 720
tcgagcggct taaagtattg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgc 780
10 ggcactctcg ggggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgac 840
gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat ttttctcatg aagggattgc 900
atatgccac cctcgcgcct tcaggtcaac ttgaaatcca agcgatcggg gatgtctcca 960
15 ccgaagccgg agcaatcatt acaaacgctg aaatcgccta tcaccgctgg ggtgaatacc 1020
gcgtagataa agaaggacgc agcaatgtcg ttctcatcga acacgccctc actggagatt 1080
20 ccaacgcagc cgattgggtg gctgacttgc tcgggtcccg caaagccatc aacactgata 1140
tttactgcgt gatctgtacc aacgtcatcg gtggttgcaa cggttccacc ggacctggct 1200
ccatgcatcc agatggaaat ttctggggta atcgcttccc cgccacgtcc attcgtgatc 1260
25 aggtaaacgc cgaaaaacaa ttctcgcagc cactcggcat caccacggtc gccgcagtac 1320
ttggtggttc catgggtggg gccgcaccc tagagtgggc cgcaatgtac ccagaaactg 1380
30 ttggcgcagc tgctgttctt gcagtttctg cacgcgccag cgcctggcaa atcggcattc 1440
aatccgcca aattaaggcg attgaaaacg accaccactg gcacgaaggc aactactacg 1500
aatccggctg caaccagcc accggactcg gcgccgccg acgcatcgcc cacctcacct 1560
35 accgtggcga actagaaatc gacgaacgct tcggcaccaa agcccaaaag aacgaaaacc 1620
cactcggctc ctaccgcaag cccgaccagc gcttcgccgt ggaatectac ttggactacc 1680
40 aagcagacaa gctagtacag cgtttcgcag ccggctccta cgtcttgctc accgacgccc 1740
tcaaccgcca cgacattggg cgcgaccgcg gaggcctcaa caaggcactc gaatccatca 1800
aagttccagt ccttgtcgca ggcgtagata ccgatatttt gtaccctac caccagcaag 1860
45 aacaccttc cagaaacctg ggaaatctac tggcaatggc aaaaatcgta tcccctgtcg 1920
gccacgatgc tttcctcacc gaaagccgcc aaatggatcg catcgtgagg aacttcttca 1980
50 gcctcatctc cccagacgaa gacaaccctt cgacctacat cgagttctac atctaaacta 2040
gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg cgttaattaa caattgggat 2100
cctctagagt tctgtgaaaa acaccgtggg gcagtttctg cttcgcgggtg ttttttattt 2160
55 gtggggcact agaccggga tttaaactgc tagcgggctg cttaaaggaag cggaacacgt 2220
agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct 2280
60 ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc 2340
gatagctaga ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc 2400
cctctggtaa ggttgggaag cctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga 2460
65 tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata 2520
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct 2580

atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc 2640
5 aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg 2700
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg 2760
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc 2820
10 tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc 2880
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg 2940
agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc 3000
15 atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg 3060
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc 3120
20 gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag 3180
cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg 3240
tgctttacgg tategccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg 3300
25 agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 3360
atcacgagat ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3420
30 ccgggaagcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 3480
cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat 3540
accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc 3600
35 tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg 3660
ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg 3720
40 ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac 3780
gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg 3840
gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct 3900
45 ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg 3960
tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct 4020
50 gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac 4080
tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt 4140
tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc 4200
55 tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca 4260
ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat 4320
60 ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac 4380
gttaagggat tttggatcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg 4440
ccggccgcgg ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc 4500
65 caaaaacttt aacgaacggt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa 4560
attggcccga atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg 4620

atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg 4680
cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc 4740
5 ttgaggagct ggctgacgag ctgctgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg 4800
aggatgcaat cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag 4860
10 gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gacgcgcgca 4920
acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc 4980
ccccgagcga aattttggcc atggctcgtc cagagctgga agcggcagcg agaattatcg 5040
15 cgatcgtggc ggtgcccgcg ggcacgacaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt 5100
ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc 5160
20 gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaataacctg aaaaatgttg 5220
aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga 5280
aagcgtcaa aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt 5340
25 tccgctgatc tgttcgacac ccatcccgag ctgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc 5400
gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc 5460
30 cgcgacttcg ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat 5520
accgagttgg ttcaaaatcg cttgcccggc gccagtatgt tgctctgacg cagcgcgacg 5580
acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg 5640
35 agcacgtaaa ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc 5700
cagcttgat cggcgtgaat cactgagcg ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgac 5760
40 cggtgtatgc cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg 5820
aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttcc acataggctg agccgtggcc 5880
actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc 5940
45 gcctagctga tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa ctaaaaaaac 6000
gctatgagca ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg 6060
50 cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg 6120
gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgatg 6180
agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc 6240
55 taaaagacac caagggcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggctc 6300
gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac 6360
60 gtgtgcgcgg ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc 6420
agagccagcc g 6431

65 <210> 50
<211> 1005
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_50_FRUCTOSE_1_6_BISPHOSPHATASE

5 <400> 50
 atgaacctaa agaacccccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgagagtt 60
 acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttgac gtggcatgaa gaatgaaggc 120
 10 gacggtgccg ctgttgacgc catgcgccag ctcatcaact cagtgacat gaagggcgctc 180
 gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggctc 240
 15 ggaaccggct ttggacctga ggttgatata gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgag ctgcagagcg tggcaccatg 360
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420
 20 aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cgttgccaaa gtccaaggga 480
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgctcgtg cttgaccgtc ctgccacat cgaactgata 540
 25 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgacagg 600
 gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660
 ccagaaggca tcatcactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcata 720
 30 ctggccccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggctt ggttcttgat 780
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggt 840
 35 gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggt tctaccgcg caaacggcgc aaccaccgct 900
 tccctggtta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960
 tccaagctgc aggaatactc cgtggttgac tacaccaccg cgacc 1005

40

<210> 51

<211> 335

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

45

<400> 51

Met	Asn	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Thr	Pro	Asp	Arg	Asn	Leu	Ala	Met	Glu
1				5					10					15	

50

Leu	Val	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Trp	Val
			20					25					30		

55

Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Asn	Glu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Met
		35					40					45			

Arg	Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Met	Lys	Gly	Val	Val	Val	Ile	Gly
		50				55					60				

60

Glu	Gly	Glu	Lys	Asp	Glu	Ala	Pro	Met	Leu	Tyr	Asn	Gly	Glu	Glu	Val
	65				70					75				80	

Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Asp	Pro	Val	Asp
			85					90					95		

65

Gly	Thr	Thr	Leu	Met	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu
			100					105					110		

56

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
115 120 125

5 Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
130 135 140

Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
145 150 155 160

10 Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
165 170 175

Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
180 185 190

15 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser
195 200 205

20 Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
210 215 220

Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile
225 230 235 240

25 Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
245 250 255

Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp
260 265 270

30 Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg
275 280 285

35 Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met
290 295 300

Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu
305 310 315 320

40 Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr
325 330 335

45 <210> 52
<211> 6
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

50 <220>
<223> SEQ_ID_52_POTENTIELLE_10_REGION_1

<400> 52
tagagt 6

55 <210> 53
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

60 <220>
<223> SEQ_ID_53_RIBOSOMALE_BINDUNGSSTELLE\SHINE_DALGARNO

<400> 53
ggagggga 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/77 C07K14/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, vol. 143 (Pt 11), November 1997 (1997-11), pages 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 the whole document ----- -/--	1-54

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 April 2005

Date of mailing of the international search report

27/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Novak-Giese, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of Neisseria gonorrhoeae"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 189, no. 1, 11 April 1997 (1997-04-11), pages 107-112, XP004059567 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the Campylobacter jejuni groESL bicistronic operon."</p> <p>MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) JAN 1999, vol. 145 (Pt 1), January 1999 (1999-01), pages 89-98, XP002323246 ISSN: 1350-0872 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 15, no. 1, 1995, pages 1-11, XP000611319 ISSN: 0950-382X the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 5-25, XP001184752 ISSN: 0168-1656 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli, Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis."</p> <p>4 September 2003 (2003-09-04), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, VOL. 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103 ISSN: 0168-1656 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of Corynebacterium glutamicum." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, vol. 104, no. 1-3, 4 September 2003 (2003-09-04), pages 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 the whole document	1-54
A	----- WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23 May 2002 (2002-05-23) the whole document -----	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PT/EP2004/014263

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0240679	A2	23-05-2002	AU
		US	3043102 A
			2003017553 A1
			27-05-2002
			23-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/77 C07K14/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE LEÓN P ET AL: "Streptomyces lividans groES, groEL1 and groEL2 genes." MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) NOV 1997, Bd. 143 (Pt 11), November 1997 (1997-11), Seiten 3563-3571, XP002323102 ISSN: 1350-0872 das ganze Dokument ----- -/--	1-54



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. April 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Novak-Giese, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/EP2004/014263

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>TAUSCHEK M ET AL: "Transcriptional analysis of the groESL operon of Neisseria gonorrhoeae"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB,</p> <p>Bd. 189, Nr. 1,</p> <p>11. April 1997 (1997-04-11), Seiten 107-112, XP004059567</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>THIES F L ET AL: "Cloning, sequencing and molecular analysis of the Campylobacter jejuni groESL bicistronic operon."</p> <p>MICROBIOLOGY (READING, ENGLAND) JAN 1999, Bd. 145 (Pt 1), Januar 1999 (1999-01), Seiten 89-98, XP002323246</p> <p>ISSN: 1350-0872</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>GUPTA R S: "EVOLUTION OF THE CHAPERONIN FAMILIES (HSP60, HSP10 AND TCP-1) OF PROTEINS AND THE ORIGIN OF EUKARYOTIC CELLS"</p> <p>MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB,</p> <p>Bd. 15, Nr. 1, 1995, Seiten 1-11, XP000611319</p> <p>ISSN: 0950-382X</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>KALINOWSKI J ET AL: "THE COMPLETE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ATCC 13032 GENOME SEQUENCE AND ITS IMPACT ON THE PRODUCTION OF L-ASPARTATE-DERIVED AMINO ACIDS AND VITAMINS"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL,</p> <p>Bd. 104, Nr. 1-3,</p> <p>4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 5-25, XP001184752</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Function of Corynebacterium glutamicum promoters in Escherichia coli, Streptomyces lividans, and Bacillus subtilis."</p> <p>4. September 2003 (2003-09-04), JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, VOL: 104, NR. 1-3, PAGE(S) 325 - 334 , XP002323103</p> <p>ISSN: 0168-1656</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-54

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014263

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>PÁTEK MIROSLAV ET AL: "Promoters of Corynebacterium glutamicum." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. 4 SEP 2003, Bd. 104, Nr. 1-3, 4. September 2003 (2003-09-04), Seiten 311-323, XP002323247 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>WO 02/40679 A2 (RAYAPATI P J) 23. Mai 2002 (2002-05-23) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-54

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

T/EP2004/014263

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Januar 2004)